P. 3-2

N° d'ordre : 447

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Mohammed CHOUMANE

Recherches sur les modalités d'association de l'acide L-ascorbique avec les Protéines. Applications — Pratiques

Soutenue le 1er juillet 1974, devant la Commission d'Examen :

M. P. CRÉAC'H, Professeur ..... *Président.*

M. le Doyen F. TAYEAU, Membre de l'Académie de Médecine, Professeur à l'Université de Bordeaux II

M. le Doyen J. BLAIZOT, Professeur .....

M^lle J. DUTRIEU, Professeur ..... *Examinateurs.*

M. P. MAINGUY, Docteur vétérinaire, Directeur de la Recherche et du Développement - Laboratoire F. HOFFMANN LA ROCHE & Cie (Neuilly-sur-Seine) .....

— 1974 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549623_0014

N° d'ordre : 447

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Mohammed CHOUMANE

Recherches sur les modalités d'association de l'acide L-ascorbique avec les Protéines.
Applications — Pratiques

Soutenue le 1er juillet 1974, devant la Commission d'Examen :

M. P. CRÉAC'H, Professeur.....	*Président.*
M. le Doyen F. TAYEAU, Membre de l'Académie de Médecine, Professeur à l'Université de Bordeaux II	*Examinateurs.*
M. le Doyen J. BLAIZOT, Professeur.....	
Mlle J. DUTRIEU, Professeur.....	
M. P. MAINGUY, Docteur vétérinaire, Directeur de la Recherche et du Développement - Laboratoire F. HOFFMANN LA ROCHE & Cie (Neuilly-sur-Seine).....	

— 1974 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents,

A mes amis.

AVANT-PROPOS-

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Radiobiologie Macromoléculaire et de Biochimie de la Nutrition que dirige Monsieur le Professeur P. CREAC'H. Nous sommes heureux de pouvoir, aujourd'hui, lui exprimer toute notre reconnaissance pour les conseils et critiques judicieux qu'il n'a cessé de nous prodiguer tout au long de ces recherches. Qu'il soit assuré de notre respectueux attachement.

Que Monsieur le Professeur F. TAYEAU, Membre de l'Académie de Médecine, Professeur à l'Université de Bordeaux II, trouve ici l'expression de ma très respectueuse gratitude pour avoir bien voulu accepter de juger notre travail.

Nous exprimons notre vive reconnaissance à Monsieur le Professeur J. BLAIZOT pour le grand honneur qu'il nous fait en acceptant de bien vouloir juger ce travail.

Nous tenons à exprimer à Mademoiselle le Professeur J. DUTRIEU, le témoignage de notre reconnaissance pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter aux résaultats de nos recherches.

Monsieur P. MAINGUY, Docteur Vétérinaire, Directeur de la Recherche et du Développement F. HOFFMANN - LAROCHE et Cie, malgré son éloignement et ses nombreuses activités a bien voulu accepter l'invitation de l'Université de Bordeaux I, à venir juger notre travail. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

Nous ne saurions oublier dans nos remerciements Monsieur TIQUET, dont la collaboration technique nous a été indispensable pour mener à bien ce travail, ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire et plus particulièrement le groupe des chercheurs. La cordialité de leur accueil et les conseils amicaux qu'ils n'ont cessé de ma prodiguer m'ont toujours apporté une aide précieuse.

SOMMAIRE.

Page

- Introduction 1

CHAPITRE I-

I - Méthodes expérimentales 5

II - Matériel et conditions expérimentales 5
2-1 - Solutions protéiques 5
2-2 - Solutions de vitamine C 5
2-3 - pH expérimental 5
2-4 - Conditions de température ... 6
2-5 - Technique de fixation 6

III- Méthodes de dosage de l'acide ascorbique 7
3-1 - Méthode spectrophotométrique 7
3-2 - Méthode colorimétrique 8

IV- Indice de fixation protéique IFP 10

V- Variations physico-chimiques relatives au phénomène de fixation 10
5-1 - Généralités 10
5-2 - Etude spectrophotométrique 11
5-3 - Etude spectropolarimétrique 12
5-4 - Etude spectrofluorimétrique 15

CHAPITRE II -
Fixation de la vitamine C sur la sérum albumine 17

I- Généralités 17

II- Propriétés de la sérum albumine 18
2-1 - Etude spectrophotométrique 18
2-2 - Etude spectropolarimétrique 18

III- Complexe sérum albumine vitamine C
Etude quelques propriétés 19

IV- Importance de la fixation en fonction du pH 20
4-1-Résultats 20
4-2-Etude spectropolarimétrique... 21
4-3-Etude spectrofluorimétrique....23

V- Importance de la fixation en fonction de la concentration en acide ascorbique.....25
5-1-Résultats 25
5-2-Etude spectropolarimétrique... 31
5-3-Etude spectrofluorimétrique... 31

VI- Variation de la fixation en fonction de la température.....34
6-1-Résultats 34
6-2-Etude spectropolarimétrique... 36
6-3-Etude spectrofluorimétrique... 36

VII- Effet de la salinité du milieu.....39
7-1-Fixation en présence de concentrations croissantes de NaCl.....39
7-2-Etude spectropolarimétrique... 42
7-3-Etude spectrofluorimétrique... 42

VIII- Effet d'un contact préalable de la sérum albumine avec NaCl sur la niveau de fixation de l'acide ascorbique.....46
8-1-Conditions expérimentales..... 46
8-2-Résultats.....50
8-3-Etude spectropolarimétrique... 50
8-4-Etude spectrofluorimétrique... 54

IX- Résistance du complexe sérum albumine -acide ascorbique en présence de NaCl
9-1-Généralités..... 54
9-2-Conditions expérimentales.....54
9-3-Résultats..... 57
9-4-Etude spectropolarimétrique... 61
9-5-Etude spectrofluorimétrique... 61

X- Action du phosphate sodique
10-1-Conditions expérimentales.... 69
10-2-Résultats..... 69

10-3-Etude spectropolarimétrique... 69
10-4-Etude spectrofluorimétrique....74

XI- Résumé et Conclusions du chapitre II...81

CHAPITRE III

I- Introduction.....83

II- Préparation de la β-lactoglobuline..... 84

III- Détermination de la masse moléculaire de la β-lactoglobuline..... 85
3-1-Généralités..... 85
3-2 -Principes et techniques 85
3-3- Résultats.....86

IV- Fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline.....87
4-1-Techniques.....87

V- Variation de la fixation en fonction du pH 88
5-1-Résultats..... 89
5-2-Etude spectropolarimétrique.... 91
5-3-Etude spectrofluorimétrique.....92

VI-Action de la température 96
6-1-Variation de la fixation en fonction de la température.....96
6-2-Etude spectropolarimétrique.... 96
6-3-Etude spectrofluorimétrique.... 99

VII- Fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline ayant subi préalablement un traitement thermique..... 99
7-1-Généralités..... 99
7-2-Résultats.....101

VIII- Variation de la fixation en fonction de la concentration vitaminique.....101
8-1-Résultats.....105
8-2-Evaluation du nombre de sites de fixation.....105

8-3-Etude spectropolarimétrique... 109
8-4-Etude spectrofluorimétrique.... 111

IX- Influence des sels sur les possibilités de fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline..... 111
9-1-Généralités..... 111

X- Répercussion de la présence de cations alcalins..... 113
10-1-Résultats..... 114
10-2-Etude spectropolarimétrique.. 124
10-3-Etude spectrofluorimétrique.. 124

XI- Répercussion de la présence de divers anions..... 131
A- Les halogénures..... 131
1- Résultats..... 131
2- Etude spectropolarimétrique 131
3- Etude spectrofluorimétrique 139

B- Les anions composés..... 139
I- Action du nitrate..... 145
a- Importance de la fixation 145
b- Etude spectropolarimétrique..... 145
c- Etude spectrofluorimétrique..... 145

II- Sulfate de sodium..... 145
a- Importance de la fixation 145
b- Etude spectropolarimétrique..... 151
c- Etude spectrofluorimétrique..... 151

III- Action de l'ortho-phosphate sodique..... 151
a- Importance de la fixation 151
b- Etude spectropolarimétrique..... 156
c- Etude spectrofluorimétrique..... 156

IV- Pyrophosphate et tripolyphosphate..... 162
1) - Pyrophosphate

a- Importance de la fixation 162
b- Etude spectropolarimétrique..... 162
2) - Tripolyphosphate..... 166
a- Importance de la fixation 166
b- Etude spectropolarimétrique..... 166

XII- Effet d'un contact préalable de la β-lactoglobuline avec NaCl sur le niveau de fixation de l'acide ascorbique.....166
12-1- Résultats..... 171
12-2- Etude spectropolarimétrique.....174
12-3- Etude spectrofluorimétrique.....174

XIII- Résistance du complexe β-lactoglobuline - acide ascorbique en présence de NaCl.. 174
13-1- Commentaires.....180
13-2- Etude spectropolarimétrique..... 190

XIV- Conclusion du chapitre III..... 196

CHAPITRE IV-
Stabilité comparée de l'acide ascorbique libre et lié à la β-lactoglobuline.....199

Introduction..... 199
I- Conditions expérimentales..... 199
II- Action de l'oxygène de l'air..... 201
III- Action de Fe..... 203
IV- Action de Mn..... 209
V- Action de Cr 213
VI- Action de Cu 218
VII- Action de l'acide citrique.....
VIII- Conclusion du chapitre IV.....225

Conclusions Générales 227

Bibliographie..... 232

INTRODUCTION

Le rôle principal de la plupart des vitamines est de s'intégrer dans les divers systèmes enzymatiques nécessaires à l'équilibre physiologique. De ce fait une carence en une vitamine donnée supprime non seulement tous les processus enzymatiques directement intéressés, mais aussi ceux qui ont pour rôle de transformer les métabolites résultant de ces processus. Il en résulte l'apparition de troubles et lésions caractéristiques.

Chez de nombreux sujets l'apport vitaminique qualitatif et quantitatif est loin d'être optimum et leur parfait équilibre biologique n'est pas atteint.

Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour expliquer cet état de choses qui s'applique aussi bien aux humains qu'aux animaux, et en particulier aux animaux d'élevage.

- Tout d'abord, il peut se faire que l'apport du régime alimentaire ne parvienne pas à assurer de façon satisfaisante la couverture des besoins vitaminiques.
- Il peut également arriver qu'à l'origine le régime soit suffisamment et de façon équilibrée pourvu en vitamines. Divers traitements préalables ou même les conditions de stockage peuvent cependant en avoir modifié le taux. (FRANCOIS (1))

En ce cas, la diminution du potentiel vitaminique ne s'effectue pas de façon uniforme ; telle ou telle vitamine plus résistante ne subira qu'une destruction relativement limitée, alors que d'autres disparaitront en presque totalité.

Il s'ensuit que le régime consommé est susceptible d'être qualitativement et quantitativement insuffisant.

Dans l'un et l'autre cas, un apport vitaminique supplémentaire devient nécessaire pour rétablir un équilibre qui s'impose et qui est autorisé en France depuis l'arrêté du 28 Mars 1968.

Lorsqu'il s'agit de l'alimentation humaine

cet apport revêt généralement une forme pharmaceutique telle que comprimés, ampoules mono- ou polyvitaminiques, etc.

Le coût des vitamines ainsi ajoutées au régime du consommateur, n'est pas un obstacle économique du fait de la production industrielle des vitamines, il est même relativement faible par rapport à la valeur de la denrée. (2)

Dans le cas de l'alimentation animale, on ajoute simplement aux aliments composés, un supplément ou "condiment vitaminique".

Celui-ci consiste en un mélange soigneusement dosé de diverses vitamines, soit pures, soit sous forme de dérivés tels que sels et esters, que l'industrie biochimique produit sur une grande échelle. Très finement pulvérisé, ce mélange est alors incorporé en plusieurs étapes et selon un processus classique, aux divers aliments composés.

Il arrive même fréquemment que des sels d'oligo-éléments indispensables soient ajoutés au pré-mélange vitaminique avant le broyage, et cet ensemble pulvérisé constitue la base d'un "condiment vitaminique et minéral" qui sera incorporé aux aliments composés de la même façon que le condiment purement vitaminique.

Bien que la vitaminisation soit universellement réalisée selon ces modalités, elle est loin d'être satisfaisante, car le potentiel vitaminique des aliments ainsi traités décroît rapidement au cours du stockage, même s il est réalisé dans les meilleures conditions de température et d'état hygrométrique.

Les raisons de cette destruction sont multiples. Citons d'abord le pH et l'oxydation, soit spontanée, soit résultant de la présence de péroxydes résultant de l'auto-oxydation des lipides présents dans l'aliment composé. Il est même très vraisemblable que certains des oligo-éléments jouent un rôle de catalyseur dans ces processus d'oxydation.

Eventuellement, la lumière et les radiations ionisantes peuvent aussi jouer un rôle destructeur.

A ces facteurs plus ou moins inévitables vient s'ajouter le fait qu'il existe des incompatibilités fondamentales au sein des mélanges vitaminiques. L'exemple, entre autres, de la rapide destruction de la vitamine B_{12} au contact de l'acide ascorbique (vitamine C) en apporte une preuve immédiate.

Le degré d'humidité de l'aliment composé

joue certainement un grand rôle ne serait-ce qu'en favorisant les contacts entre vitamines et agents de destruction. Diminuer cette humidité paraîtrait donc le plus simple et le meilleur remède à l'instabilité vitaminique, mais l'emploi de ce palliatif demeure très limité. En effet, les matières premières trop séches ne se prêtent pas à la préparation des "granulés" forme de présentation devenue traditionnelle des aliments composés, et par conséquent ceux-ci sont toujours imprégnés d'une certaine humidité qui atteint couramment 12 p. 100.

Une autre solution consisterait à limiter le temps de stockage. Sa réalisation entraînerait une révision complète du circuit de distribution, avec un approvisionnement moins abondant et plus fréquent de chaque utilisateur, ce qui se traduirait aussi par une augmentation du prix des aliments composés. De ce fait, l'application généralisée du rapide renouvellement des stocks, est difficile à mettre en oeuvre.

Nous venons donc de passer en revue les principaux facteurs chimiques, techniques et économiques qui font qu'au moment de son utilisation - sauf bien entendu si celle-ci intervient à bref délai - un aliment composé ne peut plus renfermer le taux vitaminique régulièrement annoncé à la sortie de l'usine.

Il est superflu d'insister sur les multiples inconvénients qui découlent de ce fait.

Tenter d'y remédier consiste à rechercher un moyen pratique de protéger les vitamines, c'est-à-dire de les soustraire sinon totalement, du moins partiellement aux diverses agressions du milieu ambiant.

Réalisé dans cette optique, le présent travail concerne la recherche d'un procédé susceptible d'améliorer la durée de conservation de l'acide D-L ascorbique ou vitamine C.

L'hypothèse de départ est que du seul fait de sa fixation sur une protéine par des liaisons de faible énergie, une molécule devrait se trouver partiellement protégée contre les agressions du milieu ambiant.

Le simple "enrobage" dans la gélatine principalement utilisé pour la protection des vitamines liposolubles (BROOKE(3)), ne concerne que très partiellement et de façon indirecte de l'actuel problème.

Il n'apporte en effet aucune précision sur la proportion de vitamine enrobée qui se trouve réellement fixée à la protéine et qui, de ce fait, pourrait bénéficier d'une protection.

En l'occurence, les recherches entreprises ont concerné d'abord les modalités de fixation de l'acide ascorbique sur deux protéines : la sérum albumine et la β-lactoglobuline bovines. On a ensuite comparé la durée de conservation de l'ac. ascorbique libre ou fixé à un support protéique, et suggéré quelques applications pratiques.

Ainsi schématisé, le développement paraît relativement simple. Ce n'est là qu'une apparence parce qu'il a toujours fallu rechercher, parmi les multiples conditions expérimentales possibles, celles qui permettent à la fois une fixation plus importante et une protection plus efficace de la vitamine fixée.

CHAPITRE 1

I. METHODES EXPERIMENTALES.

Avant d'étudier l'éventuel accroissement de la stabilité vitaminique résultant de la fixation de la vitamine sur une molécule protéique, il importe de connaître d'abord les modalités de fixation de cette vitamine sur la protéine en cause et les éventuelles modifications structurales qu'elle entraîne.

1-I- Matériel et conditions expérimentales.

2-I- Solutions protéiques.

L'expérimentation est conduite sur des solutions à 1 gramme par litre de protéine dans l'eau distillée. L'utilisation de l'agitation magnétique à froid permet d'obtenir des solutions parfaitement limpides qui seront ultérieurement diluées.

2-2- Solutions de vitamine C.

On réalise d'autre part une solution mère d'acide ascorbique dans l'eau distillée récemment bouillie. Elle est extemporanément diluée afin d'obtenir les diverses concentrations étudiées en une même série expérimentale.

2-3- pH expérimental.

L'expérimentation est effectuée à différents pH entre 4,0 et 7,0. Les solutions de protéine et d'acide ascorbique sont séparément ajustées au pH voulu par addition lente, sous agitation, de faibles volumes de HCl ou NaOH dilués.

L'emploi d'un tampon a été écarté de façon à ne pas introduire dans le milieu réactionnel des élé-

ments susceptibles de se fixer à la protéine et d'entrer ainsi en compétition avec la fixation de l'acide ascorbique (4).

De cette façon l'expérimentation peut être conduite à un pH déterminé en présence de la quantité minimale d'électrolyte nécessaire à l'ajustement du pH. En cours de manipulation le pH est soigneusement vérifié et éventuellement réajusté.

L'amplitude de la fixation en fonction du pH a été étudiée pour les valeurs de 4,0 - 4,5 - 5,0 6,0 - et 7,0.

Cette gamme s'insère dans les limites de pH pratiquement atteintes dans le domaine alimentaire, et elle comporte des valeurs très voisines du point isoélectrique de la sérum albumine (pH = 4,7) et de la β-lactoglobuline (pH = 5,25). Il n'a pas été envisagé d'opérer à un pH supérieur à 7,0 car l'instabilité de la vitamine C croît au fur et à mesure que le milieu devient plus alcalin.

2-4- Conditions de température.

Les recherches ont été poursuivies à deux températures 4°C et 20°C. Soulignons qu'à partir de 25° la stabilité de la vitamine C décroît rapidement.

2-5- Technique de fixation.

Le protocole expérimental utilisé est celui précédemment mis au point par DEBOURGE (6).

A 15 ml d'une solution protéique à 1 p. 100 préalablement amenée au pH voulu, on ajoute, sous agitation magnétique et à la température expérimentale, un volume égal d'une solution de vitamine C amenée au même pH. Après une demi-heure d'agitation magnétique, le pH est éventuellement réajusté. Le mélange ainsi obtenu est abandonné 16 heures à la température expérimentale.

Après ce laps de temps, on prélève 10 ml du mélange précédent et on les introduit dans un "boyau" de cellophane. La dialyse est effectuée elle aussi à la température expérimentale contre 200 ml d'eau distillée préalablement portée au même pH que la solution protéique et l'on applique la méthode de

dialyse à l'équilibre.

Cette méthode préconisée par KLOTZ (6) en 1953 a été mise au point par divers auteurs dont KARUSH (7), PALLANSCH (8), RAY (9), REYNOLDS (10) Mc MENAMY (11), qui utilisaient pour leurs investigations des solutions de sérum albumine et HILL et BRIGGS (12) qui expérimentaient sur des solutions de βlactoglobuline.

La protéine est placée dans un dialyseur constitué ici par un boyau de cellophane perméable à tous les autres composants du système et la dialyse s'effectue contre le solvant qui a servi à solubiliser la protéine.

Lorsque l'équilibre est atteint, la concentration des molécules non protéiques est identique de chaque côté de la membrane du dialyseur. Connaissant le volume total de liquide, il est alors possible de doser la concentration du ligand dans le dialysat et d'en déduire la quantité fixée.

Afin de limiter l'amplitude des erreurs expérimentales, le boyau de dialyse est cbturé par trois noeuds à chaque extrémité comme le recommande VAN OSS (13).

De plus, le boyau est préalablement trempé dans l'eau distillée pendant 15 mn, puis longuement rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les substances hydrosolubles susceptibles d'interférer avec le ligand soit au niveau de sa fixation, soit au moment de son dosage dans le dialysat (14).

La faible concentration protéique (1 p. 1000), n'influe pas sur la perméabilité, mais les conséquences de l'effet DONNAN pourraient théoriquement perturber l'exactitude des résultats (15).

Un contrôle expérimental a cependant montré que l'erreur dont il est responsable ne dépassait pas 5 p. 100.

III - Méthodes de dosage de l'acide ascorbique.

Le dosage de l'acide ascorbique peut se réaliser soit 1 - spectrophotométriquement soit 2 - colorimétriquement.

3 -1 - Méthode spectrophotométrique.

Elle est basée sur le fait que le spectre d'absorption de la vitamine C présente dans l'UV un maximum d absorption caractéristique (16).

L'expérience montre cependant que la longueur d'onde du maximum d'absorption varie légèrement en fonction du pH. Ce maximum est atteint à λ = 260 nm pour pH 4,0 et avoisine 266 nm dès que la valeur du pH est supérieure à 4,5. D'autre part, le coefficient d'extinction molaire varie aussi avec le pH comme l'indiquent les courbes qui ont servi de référence pour les divers dosage. Fig. 1.

3 - 2 - Méthode colorimétrique.

La méthode de BARAUD (17) (18) à la p-sulfophénhylhydrazine, plus spécifique que les procédés utilisant le dichlorophénolindophénol ou encore la dinitrophényl-hydrazine, a été retenue. Elle permet de doser l'acide ascorbique total. Elle comporte une oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique, au moyen de l'iode, dans des conditions bien définies. Par hydrolyse, l'acide déhydroascorbique se transforme en acide -2,3 dicétogulonique. En se combinant à la p-sulfophénylhydrazine, cet acide donne naissance à une hydrazone colorée en jaune qu'il est possible de doser colorimétriquement à 436 nm.

Ces méthodes de dosage peuvent être utilisées lorsque l'équilibre de dialyse est atteint. Afin de disposer d'une marge de sécurité en ce qui concerne la réalisation de l'équilibre, toutes les mesures ont été réalisées après 10 heures.

Technique.

Elle consiste en un dosage spectrophotométrique de l'acide ascorbique dans les 200 ml de dialysat. Si l'on admet que le volume de liquide (10 ml) présent dans le dialyseur n'a pas varié, la quantité de cet acide qui s'y trouve à l'état de molécules non fixées, est le 1/10 de celle présente dans le dialysat.

En retranchant de la quantité initialement introduite dans le dialyseur les quantités totales d'acide ascorbique à l'état indépendant présentes dans le système, on obtient indirectement, de façon reproductible et avec une précision acceptable, la quantité de cet acide fixée par la protéine dans les conditions de l'expérience. C'est ce procédé simple et rapide qui a été adopté pour des raisons de commodité, bien que le dosage à la sulfophénylhydrazine fournisse des résultats identiques.

Procédé par dialyse totale.

De réalisation plus longue que la précédente

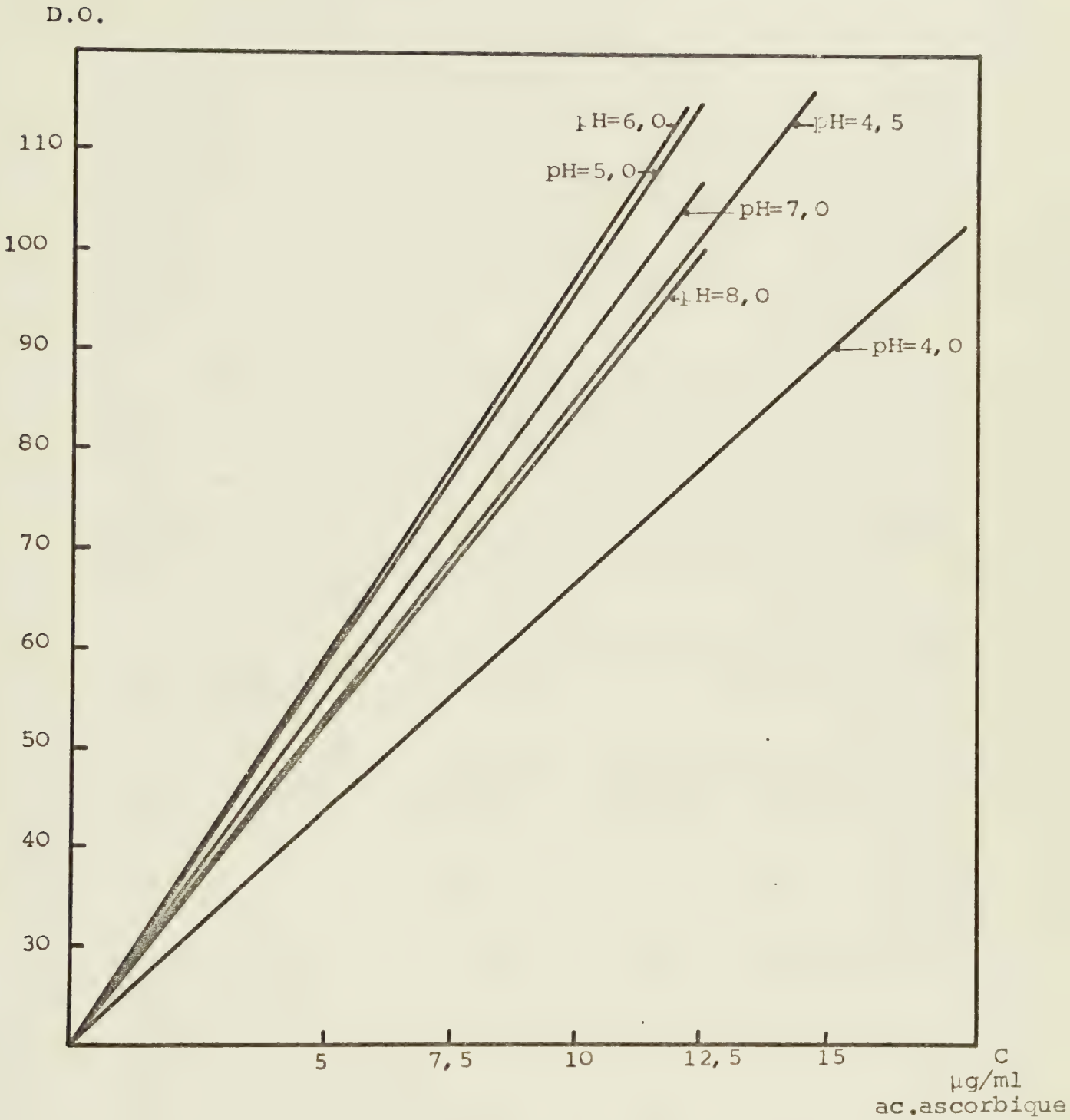


Fig. 1- Courbes de référence utilisées pour le dosage spectrophotométrique de la vitamine C. A pH = 4, 0 le tracé correspond à un maximum d'absorption à 260 mn. Pour toutes les autres valeurs du pH, les courbes ont été établies en tenant compte du fait que ce maximum se situe alors au voisinage immédiat de 266 nm.

car il faut renouveler à quatre reprises le liquide contre lequel s'effectue la dialyse, cette méthode implique en premier lieu déliminer entièrement la vitamine C libre de l'intérieur du dialyseur. Le dosage de l'ac. ascorbique peut s'effectuer soit dans les dialysats successifs, et par les méthodes précédentes, soit dans le contenu du dialyseur. En ce dernier cas, il est nécessaire de précipiter au préalable la protéine, même si l'on effectue un dosage spectrophotométrique. En effet, le maximum d'absorption de l'ac. ascorbique et celui des protéines sont très voisins(respectivement 266-270) (et 280-278 nm) et même si l'on admet que l'absorption de la lumière par l'ac. ascorbique lié à une protéine est identique à celle de l'ac. ascorbique libre, la précision des mesures est loin d'être rigoureuse.

IV - Indice de fixation protéique. IFP

Par analogie avec les travaux de DEBOURGE CREAC'H et ADELE (19), tous les résultats concernant la quantité de vitamine (C) fixée à la protéine seront éventuellement exprimés sous forme d'indice de fixation protéique IFP, défini comme étant la quantité maximum de ligand vitaminique exprimée en gramme susceptible d'être fixée par 100 g de protéine dans des conditions expérimentales bien déterminées.

V - Variationsphysico-chimiques relatives au phénomène de fixation.

5 - 1 - Généralités.

Les modalités de la fixation d'un corps sur une molécule protéique, dépendent de la structure propre à cette molécule et peuvent varier en fonction:

- de la structure primaire, c'est-à-dire de la composition en amino-acides.
- de la structure secondaire, qui traduit l'existence de liaison H, en particulier entre l'oxygène du carbonyle et l'hydrogène de l'azote amidé de la liaison peptidique.
- de la structure tertiaire qui résulte du repli sur elle-même de la protéine déjà ordonnée en structure secondaire. Ce repli résulte de la présence de liaisons covalentes (les ponts -S-S- par exemple) et surtout de liaisons de plus faible énergie telles que liaisons H, liaisons hydrophobes, liaisons polaires.

- La structure quaternaire implique la présence de sous-unités protéiques.

Lorsqu'une molécule étrangère parvient au contact d'une protéine, elle est susceptible de se lier à cette dernière :

1- par des liaisons covalentes de haute énergie ; il s'agit alors d'un processus irréversible qui transforme la structure primaire, et qui sort par conséquent du cadre des présentes recherches ;

2- par des liaisons de faible énergie.

Il faut distinguer deux cas :

a- ces liaisons s'établissent entre la molécule étrangère ou ligand et des sites disponibles sur la protéine "native".

b- bien que certains sites de celle-ci soient déjà "occupés", le ligand parvient néanmoins à s'y fixer très probablement, parce que, les liaisons susceptibles de se former entre lui et la molécule protéique s'établissent à un niveau énergétique supérieur à celui de la liaison préexistant au niveau du site considéré.

Parmi les sites privilégiés de fixation du ligand, il faut citer les restes tyrosyl, le fait est aisément contrôlable, puisque chaque fois qu'une molécule se fixe sur l'un de ces restes, le maximum d'absorption U. V de la protéine subit à la fois un effet hypsochrome et hyperchrome (20).

Quel que soit le mode de fixation, la structure tertiaire de la protéine, voire même sa structure secondaire, se trouvent modifiées. Diverses techniques physico-chimiques, et parmi celles-ci la spectrophotométrie U. V., la spectropolarimétrie et la spectrofluorimétrie utilisées au cours du présent travail, permettent l'étude de ces modifications.

5-2- Etude spectrophotométrique.

L'absorption de la lumière par les proteines dans la zone des longueurs d'onde situées entre 240 et 320 nm, est essentiellement dûe à la présence dans la molécule de restes d'acides aminés arômatiques: tyrosine, phénylalanine et tryptophane. Ces restes possèdent deux bandes d'absorption caractéristique.

-une bande très intense entre 210 et 220 nm

-une bande plus faible aux environs de 270 - 280 nm. Au - dessous de 200 nm, l'absorption des protéines est dûe en partie à la présence des groupes carboxyliques et aminés et surtout à celle de la liaison peptidique.

La fixation d'ac. ascorbique sur une protéine s'accompagne d'un effet bathochrome. Comme les spectres U. V de l'acide ascorbique et des protéines présentent un maximum d'absorption très voisin, les quantités fixées ne peuvent être aisément dosées spectrophotométriquement. Par contre, il semble toujours possible de comparer entre eux les spectres U. V de protéines ayant fixé des quantités différentes de ligand.

L'étude spectrophotométrique a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DB-G.

5-3- Etude spectropolarimétrique.

Divers auteurs comme MOFFITT (21), KAUZMANN (22), JIRGENSONS (23), SCHELLMAN (24) BLOUT, Coll (25), TOMIMATSU et Coll (26) ont consacré de nombreux travaux à l'étude des propriétés optiques de divers polypeptides. Ils ont montré en particulier l'étroite relation existant entre la structure d'une protéine et son spectre de dispersion optique rotatoire. (D. O. R)

Les structures secondaire et tertiaire des protéines étant en rapport direct avec leur pouvoir rotatoire, toute altération structurale se répercutera sur l'allure du spectre de D. O. R.

a- Pouvoir rotatoire et dispersion optique rotatoire.

On exprime souvent le pouvoir rotatoire d'une substance par la rotation spécifique $[\alpha]$ définie par la relation :

$$[\alpha]\lambda = \frac{\alpha\,\lambda}{l \times c} \times 100 \text{ dans laquelle :}$$

α = est l'angle de rotation exprimé en degrés pour la longueur d'onde λ

L = la longueur du parcours optique en décimètres

c = la concentration de la substance active en grammes pour 100 ml.

Dans le cas des polypeptides et des protéines cette relation n'est pas significative en raison du peu d'uniformité de leur masse moléculaire. Aussi préfère-t-on d'autres modes d'expression parmi lesquels :

- La rotation molaire ou pouvoir rotatoire molaire (M) défini par la relation :

$$[M] = \frac{(\alpha)\ M}{100}$$ dans laquelle:

M = est la masse moléculaire de la protéine ou du polypeptide.

- La rotation moyenne par résidu amino-acide ou pouvoir rotatoire moyen par résidu que l'on exprime par :

$$[m] \text{ ou } [R] = \frac{[M]}{n} = \frac{[\alpha] \times \overline{MRm}}{100}$$

n = représentant le nombre de résidus amino-acides de la chaîne polypeptidique et
$\overline{MRm}$ = la masse moléculaire moyenne d'un résidu. $\overline{MRm}$ varie entre 110 et 120. Pour la plupart des protéines globulaires $[m]$ est donc supérieur à $[\alpha]$ d'environ 10 à 20 %.

Ce dernier mode d'expression est actuellement le plus utilisé dans le cas des molécules de taille importante.

Le pouvoir rotatoire d'une substance en solution dépend de la polarisabilité du milieu dans lequel elle se trouve, donc de son indice de réfraction. Afin d'éliminer l'erreur due aux variations de cet indice de réfraction, il est plus rigoureux de rapporter le pouvoir rotatoire à celui qu'aurait la substance dans le vide en introduisant le facteur de correction de LORENTZ $\frac{3}{n^2 \lambda + 2}$ dans lequel n est l'indice de réfraction du solvant à la longueur d'onde λ, cette valeur étant reliée à λ par l'approximation de SELLMEIER.

$$n^2 = \frac{\lambda + a\lambda^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$$

On est ainsi amené à exprimer le pouvoir rotatoire par résidu moyen corrigé du solvant.

$$[m'] \lambda = \frac{3}{n^2 \lambda + 2} [m] \lambda$$

——b- Relation entre structure et modifications du pouvoir rotatoire.

L'étude de la variation du pouvoir rotatoire à une longueur d'onde donnée a été très largement utilisée pour suivre la dénaturation des protéines (27) (28). Cette technique étant très vite limitée au point de vue quantitatif, on lui a préféré par la suite, la dispersion optique rotatoire (DOR), c'est-à-dire l'étude de la variation du pouvoir rotatoire en fonction de la longueur d'onde. Les travaux de MOFFITT (29) et de YANG et DOTY (30), ont en effet montré qu'il existe une relation particulière entre la structure polypeptidique et la dispersion optique rotatoire.

Toute transformation ou dénaturation pourrait se traduire par une modification du spectre DOR de la molécule protéique, en particulier lorsque cette dénaturation interviendrait au niveau des structures secondaires et tertiaires. L'emploi de ces méthodes devrait permettre d'apprécier une éventuelle perturbation apportée à la structure protéique, du fait de la fixation du ligand vitaminique.

Toutes les mesures de DOR ont été réalisées à l'aide d'un SPECTROPOL, I.* Cet appareil muni d'un dispositif d'enregistrement automatique permet d'opérer avec une sensibilité de 10^{-3} degrés dans un domaine de longueurs d'onde s'étendant de 190 à 600 nm. L'oxygène atmosphérique ambiant, absorbant le rayonnement UV dans le domaine des faibles longueurs d'onde, il est alors nécessaire d'expérimenter sous courant d'azote. La gamme de longueurs d'onde présentement explorée s'étend de 200 à 300 nm et recouvre une partie du domaine d'absorption UV des protéines. Les différentes mesures sont effectuées dans une cuve de quartz de 1 cm de trajet optique, dont la température est maintenue à 25°C.

Entre 200 et 310 nm, le spectre de DOR des protéines présente un effet Cotton caractéristique des structures hélicoïdales.

Si avec JIRGENSONS (31), on admet que pour une molécule entièrement sous forme d'hélice α, la valeur de $m'_{[233]}$ est -14500 et que pour une molécule dont la structure est entièrement inorganisée

* Construit par FICA Le Mesnil Saint-Denis

$[m']_{233}$ atteint seulement -1800, le pourcentage d'hélicité α est donné par la relation

$$\text{Hélicité } \% = \frac{[m']_{233} - 1800}{14500 - 1800} \times 100$$

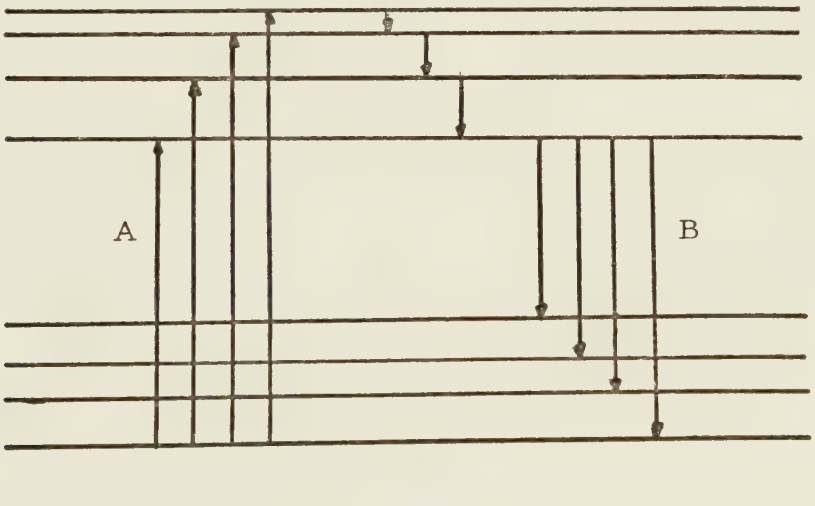
5-4- Etude spectrofluorimétrique.

C'est à l'étude des propriétés spectrales dans le domaine de l'ultra violet que l'on doit une bonne part des connaissances actuelles concernant la structure et les changements de conformation des protéines. Nouvellement exploitées les techniques de fluorescence ont permis non seulement de confirmer des notions acquises mais aussi, d'y apporter d'importantes précisions.

Généralités.

Lorsqu'elles sont éclairées par une radiation excitatrice, certaines substances en solution émettent à leur tour un rayonnement. D'après PERRIN :

- on parle de fluorescence si l'émission a lieu par une ou plusieurs transitions spontanées : la figure ci-dessous représentant différents niveaux énergétiques explique de façon schématique ce phénomène.



Si une molécule est portée par une excita-

tion électromagnétique de l'état fondamental à l'état excité (mécanisme A), le retour à l'état fondamental s'effectue par une restitution d'énergie qui peut prendre alors l'aspect d'une émission de lumière (mécanisme B). Cette fluorescence se manifeste un temps t inférieur à 10^{-8} seconde (32) après le processus A ; "T" représente la durée de vie sur le niveau excité.

-si, au contraire, l'émission se fait avec passage par un état métastable intermédiaire, suivi d'un retour à l'état excité du fait d'un apport extérieur d'énergie, il se produit une phosphorescence.

Les protéines possèdent des propriétés de fluorescence dans l'ultra-violet que WEBER et Coll. (33) ont plus particulièrement étudiées.

Nous rappellerons que ces propriétés sont dûes à la présence de restes de tyrosine et surtout de tryptophane dans la molécule protéique. Ces deux acides aminés possèdent un spectre d'émission dont le maximum se situe à 303 nm pour la tyrosine et 350 nm pour le tryptophane. Quand ces deux restes sont simultanément présents dans la protéine, le spectre d'émission de la tyrosine semble être supprimée (32) et celui de la molécule protéique correspond alors à celui du tryptophane.

Dans tous les cas, une modification du spectre de fluorescence des protéines correspond à des changements de conformation. Ces changements se situent au niveau des restes d'acides aminés aromatiques ou dans leur voisinage immédiat.

Techniques et matériel.

Les mesures de l'intensité de fluorescence sont effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre différentiel absolu FICA type .55. Les spectres d'excitation sont corrigés automatiquement par l'intermédiaire d'une cellule de Rhodamine B prise comme référence. La correction des spectres d'analyse est, elle aussi, réalisée automatiquement. Un dispositif à double faisceau permet en outre d'éliminer une éventuelle fluorescence du solvant. Les solutions protéiques sont réalisées dans l'eau distillée ou renfermant en solution divers sels, et amenées à différentes concentrations et pH selon l'étude à réaliser.

CHAPITRE II.

FIXATION DE LA VITAMINE C SUR LA SERUM ALBUMINE

I. Généralités.

La première partie du présent travail expérimental est réservée à l'étude de la fixation de l'ac. ascorbique sur la sérum albumine bovine.

Cette protéine est en effet la plus abondamment répartie de celles du sérum bovin qui, d'après BANERGEE et CHATTERJEA (34) sont capables de fixer des quantités plus ou moins importantes de vitamines.

DESGREZ et De TRAVERSE (35),attribuent cette capacité à la multitude des fonctions chimiques libres portées par les restes d'acides aminés des protéines présentes.

En plus des arguments d'ordre pratique qui tiennent compte d'une éventuelle utilisation industrielle des protéines sériques du boeuf, il est apparu que le choix de la sérum albumine présentait d'autres avantages :

- En premier lieu, cette protéine est capable de fixer de nombreux ligands. BENHOLD (36) en dénombrait une trentaine dont des vitamines, et d'autres auteurs (37) (38) (39) (40) (41) ont encore allongé cette liste en essayant de préciser les quantités fixées. DEBOURGE (42) a même proposé de traduire ces quantités sous forme d'Indice de Fixation.

La sérum albumine semblait donc susceptible de fixer des quantités relativement élevées d'ac. ascorbique ou vitamine C.

- Le second avantage que présente cette protéine sérique est qu'on peut l'obtenir aisément à l'état cristallisé. Or, pour une meilleure approche des modalités de fixation, il est toujours préférable d'opérer sur une protéine pure afin d'éliminer d'éventuelles réactions parasites dues aux impuretés présentes.

- La sérum albumine peut donc logiquement servir de "modèle" pour une étude fondamentale des modalités de fixation d'un métabolite tel que la vitamine C. Ce

choix devrait en outre permettre de comparer utilement ces modalités à celles de la fixation d'autres ligands.

Enfin, sur le plan physiologique, les résultats obtenus devraient fournir d'intéressantes précisions sur la manière dont l'un des composants du sang circulant était capable de véhiculer l'acide ascorbique.

II. Propriétés de la sérum albumine native.

Avant d'étudier les variations de certaines des propriétés physico-chimiques de la sérum albumine bovine sous l'effet de la fixation de l'acide ascorbique, il apparaît nécessaire de rappeler celles de la sérum albumine native. Il s'agit aussi de tester la sérum albumine utilisée et de contrôler si ses caractéristiques sont conformes à celles déjà mentionnées par d'autres auteurs.

2-1- Etude spectrophotométrique U. V.

On prépare une solution de sérum albumine bovine dans l'eau distillée, sous agitation magnétique à une concentration de 0,5 g/litre.

Si l'on mesure la densité optique de la solution ainsi préparée et portée à différents pH, on constate que la densité optique demeure sensiblement constante et que le maximum d'absorption se présente immuablement à 280 nm.

pH	4	4,5	5	6	7	8
Do x 10^2	33	34	33	33	33	36

Ces résultats confirment ceux obtenus par ADELE (43).

2-2- Etude spectropolarimétrique.

L'étude spectropolarimétrique des solutions de sérum albumine bovine a été réalisée pour les divers pH expérimentaux, principalement dans la gamme des longueurs d'onde où se produit un effet Cotton simple. Une attention particulière a été apportée à l'éva-

luation des modifications du pourcentage d'hélicité α.

L'effet Cotton se caractérise par la présence d'un pic à 205 nm et d'un creux à 233 $\pm$ 1 nm, quelleque soit la valeur du pH, le point de rotation nulle se situe à 221 nm.

Si l'on admet que le nombre moyen de restes d'acides aminés est 115, on obtient des dispersions optiques rotatoires dont l'amplitude varie avec le pH et les pourcentages correspondants d'hélicité α indiqués dans le tableau I.

Tableau I.

Dispersion optique rotatoire et pourcentage d'hélicité d'une solution à 0,05 g/litre de sérum albumine bovine amenée à diverses valeurs de pH.

pH	4,0	4,5	5,0	6,0	7,0	8,0
DOR	-6848,6 $\pm$100	-6936,3 $\pm$100	-7199,8 $\pm$100	7199,6 $\pm$100	-7463 $\pm$100	-8077 $\pm$100
Pourcentage d'hélicité α	40	40	42,5	42,5	44	49

D'après JIRGENSONS (23) et BLOUT (44), la sérum albumine bovine peut être classée parmi les protéines possédant un fort pourcentage d'hélicité α.

Les valeurs trouvées présentement variant de 40 à 49 p. 100, s'inscrivent donc dans les limites de 40 à 50 p. 100 indiquées par les auteurs précédents. Elles confirment ainsi le fait que la sérum albumine utilisée répond bien aux normes admises et apportent d'intéressantes précisions concernant les variations de l'hélicité en fonction du pH.

III- Complexe sérum albumine - vitamine C
Etude de quelques propriétés.

Si l'acide ascorbique est susceptible de se fixer sur une protéine et plus particulièrement sur la sérum albumine bovine, il semblerait à priori que

les quantités fixées soient susceptibles de varier en fonction des conditions ambiantes : pH, concentration en ligand, température, concentration des ions minéraux présents et nature de ces ions.

Il importe donc de connaître l'amplitude de ces variations afin de posséder tous les éléments nécessaires à l'estimation des conditions les plus favorables à une utilisation pratique d'un complexe sérum albumine + vitamine C.

IV - Importance de la fixation en fonction du pH.

4-1- Résultat.

On se propose de suivre les variations éventuelles de l'IFP de la sérum albumine placée en présence de l'acide ascorbique ; dans une gamme de pH s'étendant de 4,0 à 7,0. Ces valeurs de pH ont été choisies parce qu'elles s'inscrivent dans les limites de celles des denrées habituellement consommées. La technique utilisée est celle exposée précédemment et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau II.

Au cours de cette série expérimentale, la concentration de sérum albumine (0,5 g/litre) et de vitamine C ($2,5 \times 10^{-3}$ M) mises en présence ainsi que la température (20°C) demeurent constantes. Seules les valeurs du pH varient, mais la force ionique est maintenue aussi faible que possible. (Tableau II).

Tableau II.

Variations, en fonction du pH, de la fixation de la vitamine C sur la sérum albumine bovine.

pH	4,0	4,5	5,0	6,0	7,0
IFP	24,2	20	26,4	32	26
Molécules d'ac ascorbique fixées par molécule de protéine	92,1	76	100,5	121,8	99

De l'étude de ce tableau il ressort que :
- quelle que soit la valeur du pH, la vitamine C se fixe sur la sérum albumine.

- Entre pH 4,0 et 7,0, l'importance de la fixation varie et passe par un maximum à pH 6,0.

- Au voisinage du point iso-électrique, on remarque une légère diminution de l'IFP. Fig. 2.

4-2- Etude spectropolarimétrique.

D'une façon générale, la fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine entraîne une modification du spectre DOR de la protéine, particulièrement sensible dans la bande de l'effet Cotton. Précisons tout d'abord que dans la bande spectrale étudiée, l'acide ascorbique est dépourvu d'effet Cotton, et en conséquence il n'interfère pas avec les mesures réalisées sur la sérum albumine dont l'extrêmum négatif du spectre DOR se situe à 233 nm.

Tableau III.

Variations de l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton et de l'hélicité d'un complexe sérum albumine - acide ascorbique obtenu à différentes valeurs de pH.

Sérum albumine nat.			Complexe sérum albumine acide ascorbique	
pH	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %
4,0	-6848,6 $\pm$ 100	40	-6233,9 $\pm$ 100	34
4,5	-6936,3	40	-6848	39,7
5,0	-7199,8	42,5	-6936,3	40
6,0	-7199,6	42,5	-7551	45
7,0	-7463,2	44	-7551	45

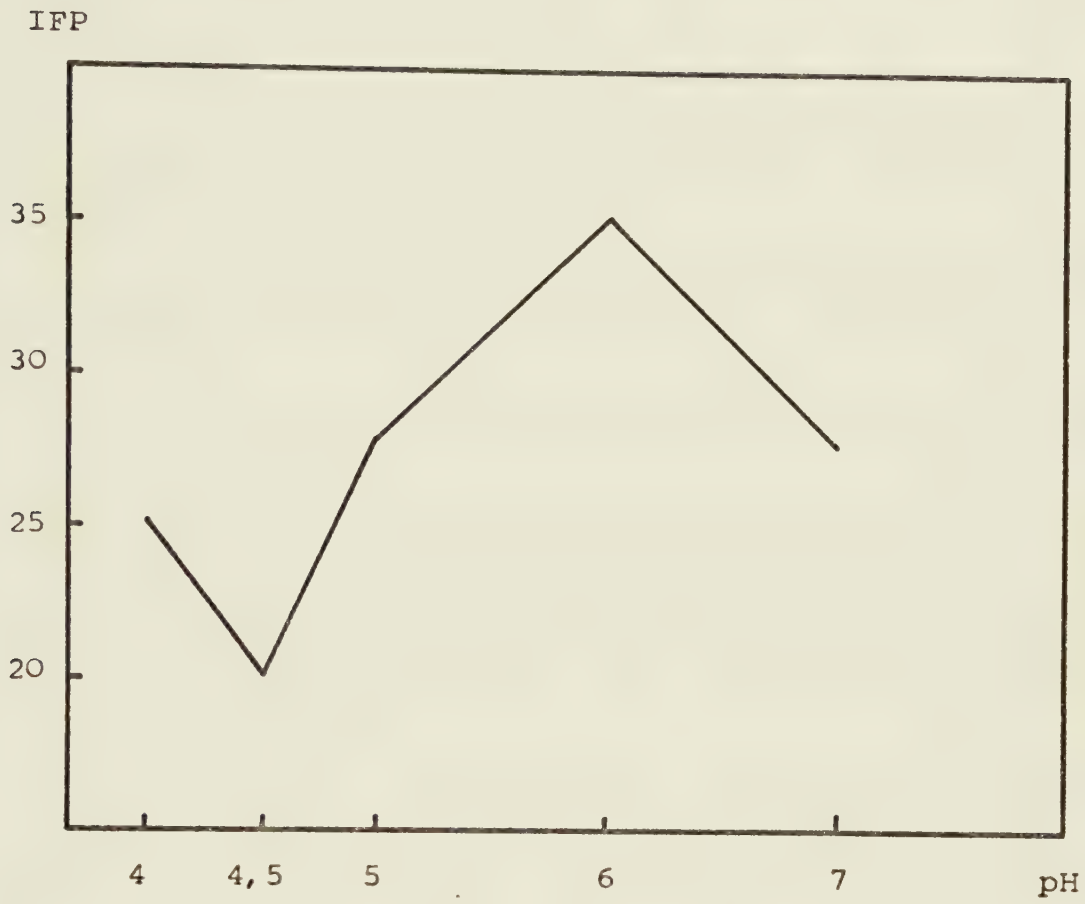


Fig. 2- Variations de l'IFP en fonction du pH
Sérum albumine à 0,5 g/litre, température 20°C, concentration vitaminique 2,5 x 10^{-3} M.

En fonction des conditions expérimentales l'étude des variations des rotations spécifiques $[\alpha]_{233}$ de la protéine native permet d'observer une augmentation d'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton. Un léger glissement du pic vers les faibles longueurs d'onde n'a jamais dépassé une amplitude compatible avec l'erreur de mesure.

Sauf à pH 6,0 et 7,0, où se manifeste un léger développement, la fixation du ligand entraîne un comblement du creux spectral, ce qui correspond à une diminution de l'hélicité α.

En principe, les variations de l'hélicité correspondent à une réorganisation structurale se manifestant principalement au niveau de la structure tertiaire.

Cette réorganisation pourrait être dûe :

-Soit à une variation de charge de la molécule protéique,

-soit à l'effet stérique de l'acide ascorbique se traduisant par une diminution du pourcentage de structuration, diminution que la spectropolarimétrie ne permet pas de chiffrer avec précision lorqu'il s'agit de protéines. Les valeurs indiquées ici pour l'hélicité α sont donc approchées mais le sens des variations constatées est évidemment exact.

-On notera que l'augmentation apparente de l'hélicité α consécutive à la fixation de l'acide ascorbique à pH 6,0 et 7,0, traduit peut-être l'organisation en hélice α des molécules de ligand et éventuellement d'eau entourant la molécule protéique, et non une augmentation de l'hélicité propre à cette dernière. En tout état de cause, ces mesures spectropolarimétriques ne fournissent que des indications sur la structuration globale du système.

4-3- Etude spectrofluorimétrique.

La longueur d'onde d'excitation étant fixée à 280 nm $\pm$ 1 nm, les spectres de fluorescence des solutions de protéine native et de son complexe avec l'acide ascorbique sont enregistrés entre 300 et 400 nm.

Précisons que dans la bande spectrale et pour les pH étudiés, l'ac. ascorbique est dépourvu de fluorescence.

L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.

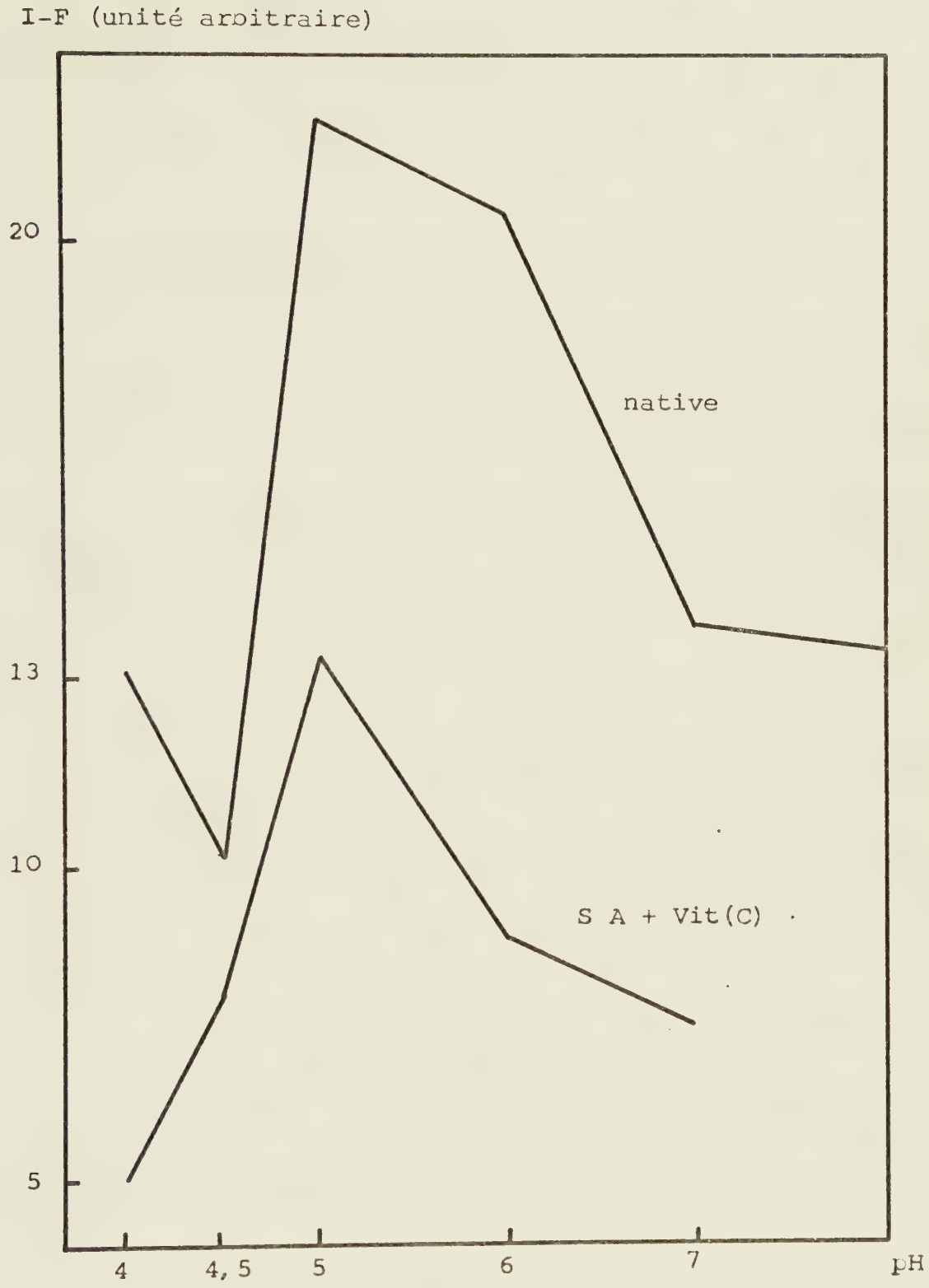


Fig. 3- Variations comparées en fonction du pH du maximum de l'intensité de fluorescence de la sérum albumine avant et après fixation d'acide ascorbique (unités arbitraires). Sérum albumine à 0,5 g/litre ; acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M . Température 20°C.

Commentaires.

Une diminution de l'intensité de la fluorescence résulte toujours de la fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine.

Cette fixation s'effectue donc sur des sites situés dans le proche voisinage de restes de tryptophane ou comportant eux-mêmes un ou plusieurs de ces restes.

V- Importance de la fixation en fonction de la concentration en acide ascorbique.

Il s'agit d'étudier, pour une valeur déterminée du pH et à température constante, l'influence de la concentration du milieu sur la quantité d'acide ascorbique fixé sur une même quantité de sérum albumine bovine.

Cinq séries expérimentales au sein desquelles on a fait varier la concentration vitaminique, correspondent à cinq valeurs de pH. La force ionique a toujours été maintenue la plus faible possible. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau IV. (Voir tableau IV page suivante).

5-1- Résultats.

Il ressort de l'étude du tableau IV que pour une même valeur du pH, l'IFP croît quand augmente la concentration vitaminique. Fig. 4-a.

Il convient alors de remarquer que la valeur du rapport : acide ascorbique fixé sur la sérum albumine / acide ascorbique initialement présent dans le milieu x 100, décroît lorsqu'augmente la concentration en acide ascorbique. Fig. 4-b.

Evaluation du nombre de sites de fixation par la méthode de SCATCHARD.

Le tableau IV fait état du nombre de molécules d'acide ascorbique fixées sur la sérum albumine, mais n'indique pas le nombre des sites de cette protéine qui se trouvent impliqués dans ce processus de fixation.

Afin d'évaluer ce nombre, on a appliqué la représentation bien connue que SCATCHARD a mise au point en 1949 (45) et dont l'équation s'écrit :

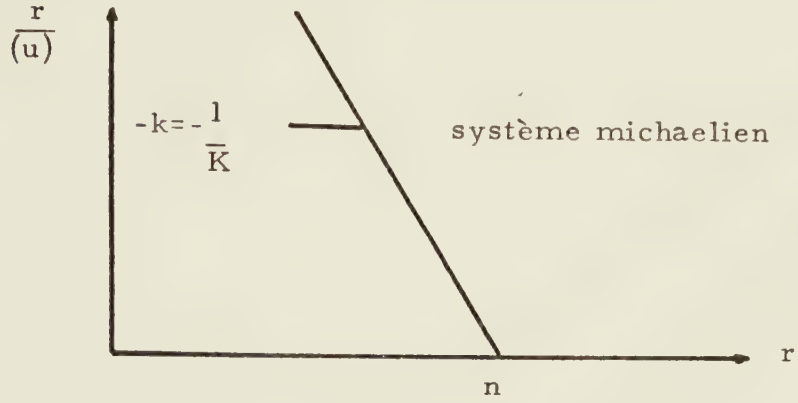
$$\left[\frac{r}{n}\right] = Kn = Kr$$

Tableau IV

pH	Expression de la fixation	Concentration initiale en acide ascorbique			
		$1,25 \times 10^{-3}$M	$2,5 \times 10^{-3}$M	5×10^{-3}M	10^{-2}M
4,0	IFP	14	24,2	32	80
	moles d'ac. ascorbique fixées/mole de protéine	53,3	92,1	12 1,8	304
4,5	IFP	12	20	30	76
	moles d'ac. ascorbique fixées/mole de protéine	45,56	76	114	289,3
5,0	IFP	16,4	26,4	36	76
	moles d'ac. ascorbique fixées/mole de protéine	62,4	100,5	137	289,3
6,0	IFP	22	32	52,8	80
	moles d'ac. ascorbique fixées/mole de protéine	83,7	121,8	201	304
7,0	IFP	18	26	48	52
	moles d'ac. ascorbique fixées/mole de protéine	68,5	99	182,6	198

Variations de la fixation de l'acide ascorbique en fonction de sa concentration et du pH, sérum albumine à 0,5 g / litre.

r est le nombre moyen de sites occupés.
u est la concentration de ligand libre.
n est le nombre total de sites pouvant être occupés / molécule de protéine.
k est la constante d'association, c'est-à-dire l'inverse de la constante de dissociation K.



Cette formule permet d'obtenir le k, le n de sites de fixation.

Tableau IV-b.

pH	n=nombre de sites occupés /mole de sérum albumine	K=constante d'équilibre ou de dissociation
4, 0	186	2×10^{-3}M
4, 5	170	$2,2 \times 10^{-3}$M
5, 0	230	$2,2 \times 10^{-3}$M
6, 0	262	$11,7 \times 10^{-3}$M
7, 0	244	2×10^{-3}M

L'équation de SCATCHARD conduisant dans le cas présent à une représentation linéaire, l'interprétation courante peut ici être appliquée et le nombre de sites calculés avec une bonne approximation

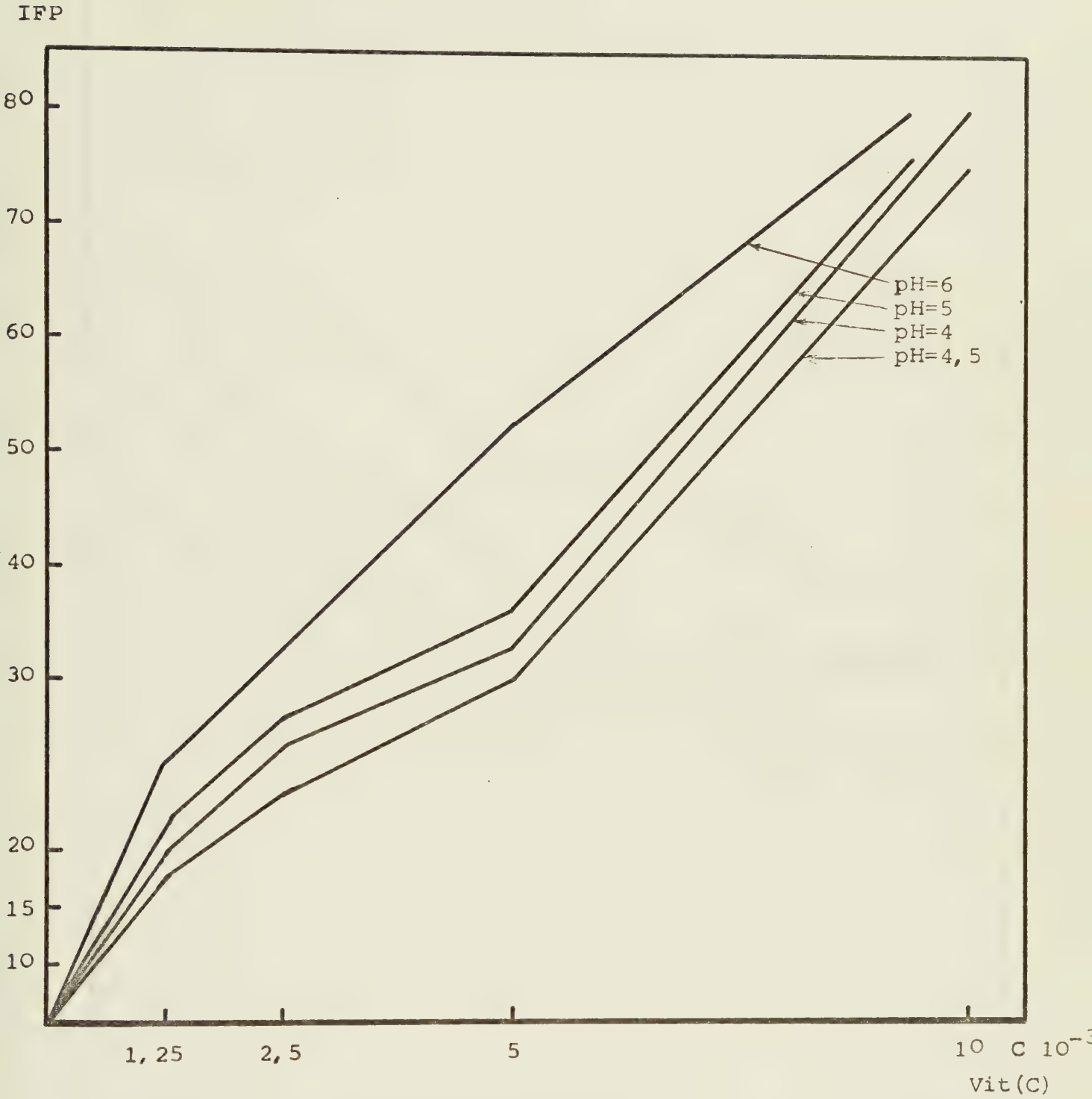


Fig. 4-a- Variations de l'IFP en fonction de la concentration en acide ascorbique et du pH, sérum albumine à 0, 5 g/litre. Température 20°C.

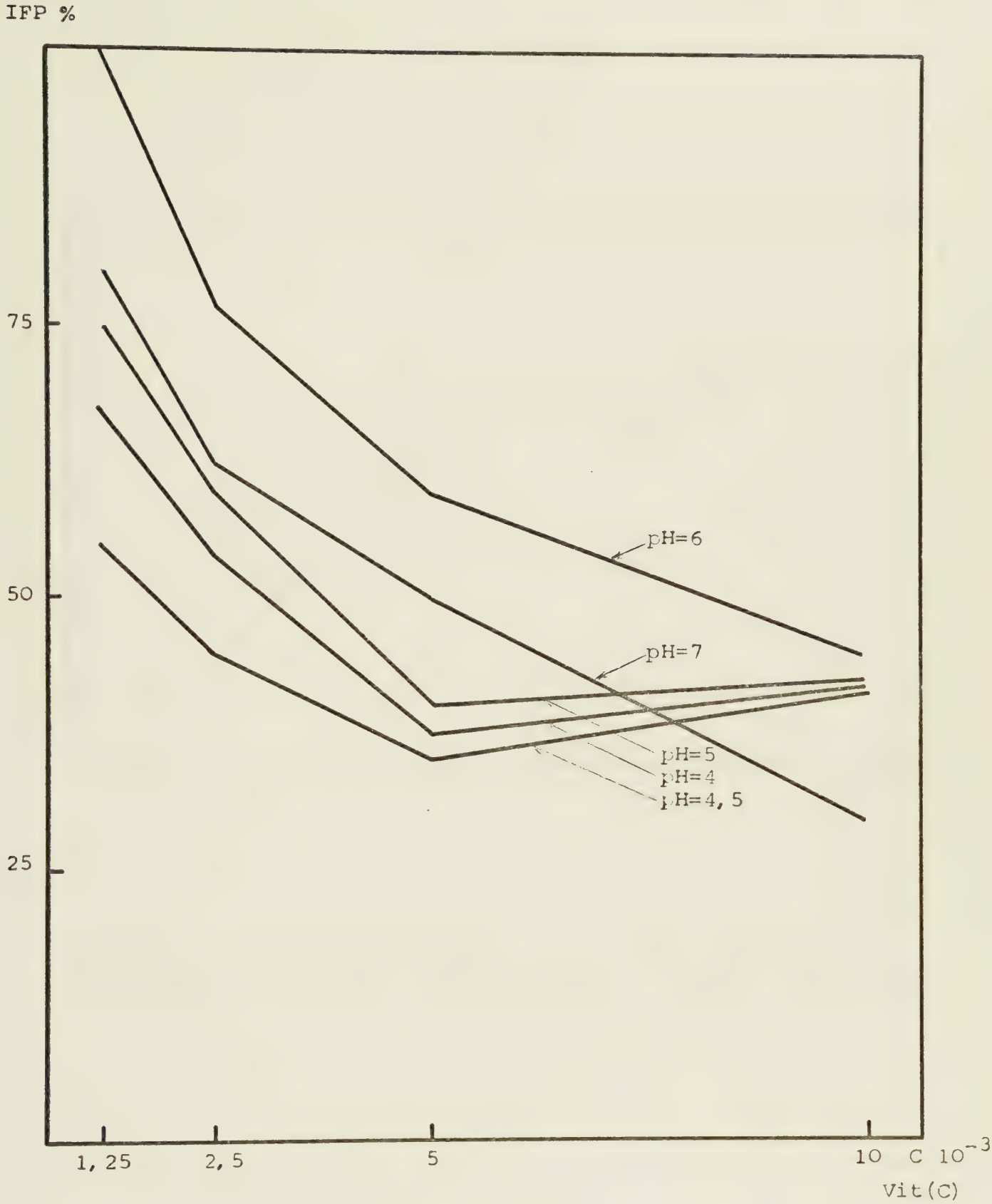


Fig. 4-b- Pourcentage de fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine en fonction de sa concentration initiale et du pH.

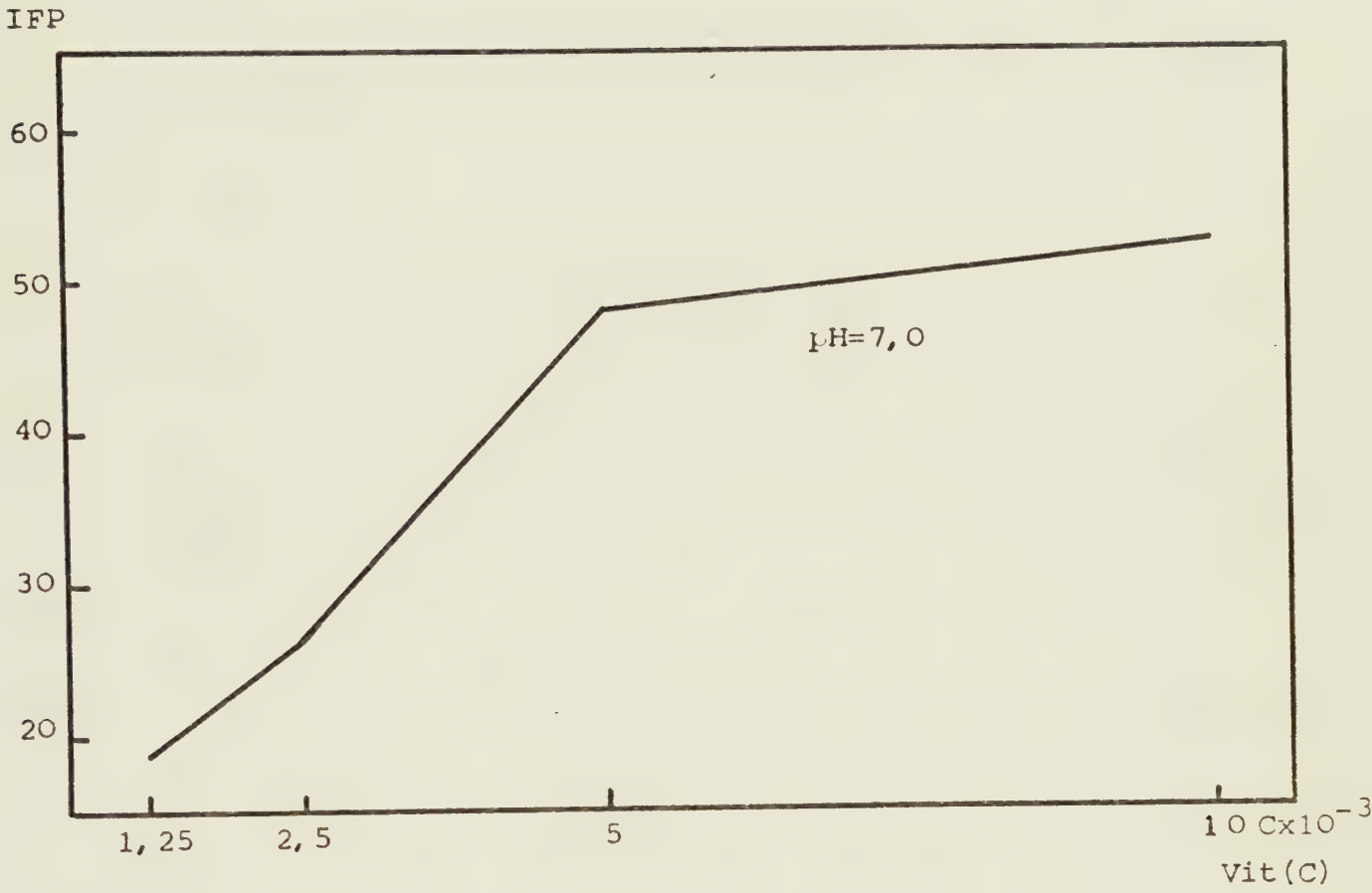


Figure 4 - a'- Variations de l'IFP en fonction de la concentration en acide ascorbique et du pH, sérum albumine à 0,5 g/litre. Température 20°C.

—5-2- Etude spectropolarimétrique. DOR.

L'étude spectropolarimétrique a permis d'apprécier pour chacun des pH étudiés le sens des variations structurales du complexe sérum albumine + ac. ascorbique lorsque sont fixées des quantités de plus en plus importantes d'acide ascorbique.

Les valeurs des divers pouvoirs rotatoires spécifiques sont exposées dans le tableau V. (voir page suivante).

Résultats.

L'étude des spectres de DOR montre une diminution de l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton pour certaines valeurs du pH et une augmentation pour d'autres.

En régle générale, ces variations sont de faible amplitude. Rappelons qu'une augmentation d'amplitude pourrait refléter des modifications de l'organisation des molécules d'eau et de ligand entourant la molécule protéique.

—5-3- Etude spectrofluorimétrique.

La longueur d'onde d'excitation étant fixée à 280 ± 1 nm, les mesures de fluorescence sont enregistrées entre 300 et 400 nm.

Rappelons que dans la bande spectrale étudiée, l'acide ascorbique est dépourvu de fluorescence.

Il faut ensuite mentionner que dans les actuelles conditions expérimentales (force ionique réduite au minimum) le spectre de fluorescence de la sérum albumine avant et après fixation du ligand se situe invariablement au voisinage immédiat de 340 nm. Les variations de l'intensité maximum de la fluorescence à cette longueur d'onde sont indiquées figure 5.

Conclusion.

---pour une valeur donnée de pH, l'intensité de la fluorescence du complexe sérum albumine + acide ascorbique est plus faible que celle de la sérum albumine native.

Tableau V.

pH	DOR	sérum albumine native	Complexe sérum albumine - ac. ascorbique			
			$1,25 \times 10^{-3}$ M	$2,5 \times 10^{-3}$ M	5×10^{-3} M	10^{-2} M
4,0	$[\alpha]$ 233	-6848,6	-64095	-6233,9	-5355	-6760
	hélicité %	40	36,2	34	28	39
4,5	$[\alpha]$ 233	-6936	-6848	-6840	-7375	-7199
	hélicité %	40	39,8	39,7	43,9	42
5,0	$[\alpha]$ 233	-7199	-6760	-6936	-7638,8	-7463
	hélicité %	42	39	40	45,8	44
6,0	$[\alpha]$ 233	-7199	-5568	-7551	-8443	-8253
	hélicité %	42	27,3	45	52	528
7,0	$[\alpha]$ 233	-7463	-7638	-7551	-8955	-8604
	hélicité %	44	45,9	45	56	53

Variations des pouvoirs rotatoires spécifiques et de l'hélicité en fonction de diverses concentrations en acide ascorbique à différents pH. Sérum albumine à 0,5 g/l.

Fig. 5- Variations comparées en fonction de la concentration vitaminique et du pH, du maximum de l'intensité de fluorescence de la sérum albumine avant et après fixation d'acide ascorbique (unités arbitraires). Sérum albumine à 0,5 g/litre; température à 20°C. 1 - native - 2 : $1,25 \times 10^{-3}$M - 3 : $2,5 \times 10^{-3}$M - 4 : 5×10^{-3}M - 5 : 10^{-2}M. acide ascorbique.

- - -pour toutes les valeurs de pH, la décroissance de l'intensité de la fluorescence est d'autant plus marquée que la quantité d'acide ascorbique fixée est importante

VI- Variation de la fixation en fonction de la température.

En principe, il est très intéressant de réaliser une opération industrielle à la température ambiante, ce qui évite une consommation supplémentaire d'énergie.

Cependant, si une modification de la température entraîne une variation considérable du rendement, une telle modification doit être envisagée.

Dans le cas présent, il importe donc de connaître l'amplitude d'éventuelles modifications de la fixation de l'acide ascorbique en fonction de la température.

A cette fin, on a seulement testé deux températures : +4°C et +20°C. Cette dernière température n'a pas été dépassée car la stabilité des solutions vitaminiques exposées à l'air eut été nettement plus précaire.

La fixation a été réalisée à différents pH, pour une concentration protéique et une concentration vitaminique constantes (respectivement 0,5g/litre et $2,5 \times 10^{-3}$M dans l'eau distillée). L'importance de la fixation est évaluée comme précédemment par spectrophotométrie.

6-1- Résultats.

Ils sont exposés dans le tableau VI Fig-6.

---De l'étude de ce tableau, il ressort que dans la zone de températures étudiées, la fixation passe par un minimum au point isoélectrique et à son voisinage immédiat.

---La fixation s'accroît lorsque s'élève la température. Ce phénomène semble en accord avec le fait que sous l'influence de l'énergie thermique, la molécule protéique se déploierait. Certains sites de fixation préalablement masqués dans la protéine native se trouveraient alors disponibles (46).

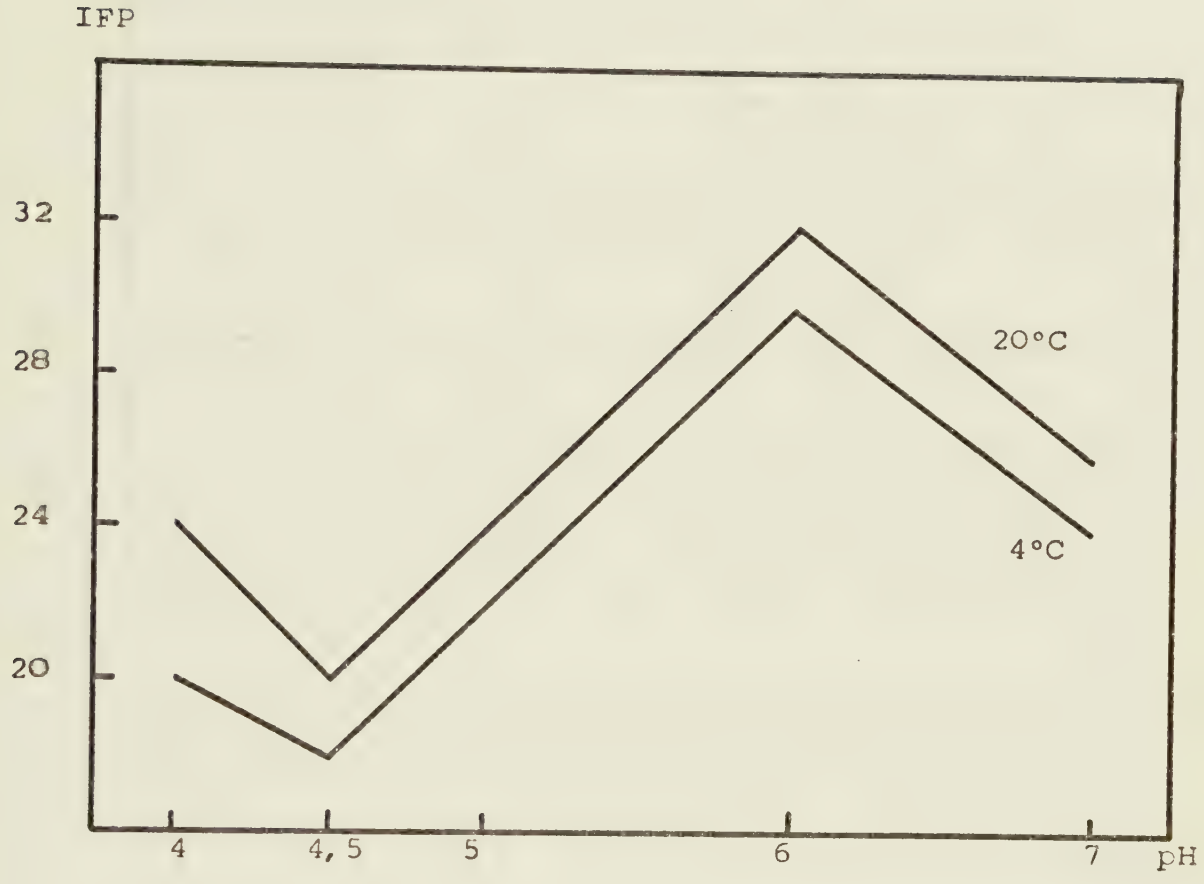


Fig. 6- Variations de l'IFP en fonction de la température et du pH. Sérum albumine à 0,5 g/l; acide ascorbique 2,5 x 10^{-3} M.

Tableau VI-

température	expression de la fixation	valeurs du pH			
		4	4,5	6	7
4°C	IFP	20	18	30	24
	moles d'ac. ascorbique / mole de protéine	76	68,5	114	91,3
20°C	IFP	24	20	32	26
	moles d'ac. ascorbique / mole de protéine	91,3	76	121,8	99

Variations de la fixation de l'acide ascorbique en fonction du pH et de la température. sérum albumine à 0,5 g/l. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M.

6-2- Etude spectropolarimétrique. DOR

Résultats.

Par comparaison avec ce que l'on observe sur la protéine native, l'amplitude de l'extrêmum négatif à 233 du complexe sérum albumine + acide ascorbique diminue à pH 4,0 et 4,5, mais croît légérement à pH 6,0 et 7,0. Ces variations d'amplitude sont plus nettes à 20°C qu'à 4°C et se trouvent donc sous la dépendance de la quantité de ligand fixée. (Tableau VII).

6-3- Etude spectrofluorimétrique.

Les variations de l'intensité maximum de la fluorescence sont indiquées figure 7.

---Aux températures étudiées et pour une valeur donnée de pH, l'intensité de la fluorescence du complexe sérum albumine + acide ascorbique est plus faible que celle de la sérum albumine native.

---Pour toutes les valeurs de pH, la décroissance de l'intensité de la fluorescence est d'autant plus

Tableau VII-

Température	Présentation de la sérum albumine	Valeurs du pH							
		4, 0		4, 5		6, 0		7, 0	
		$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %
4°C	native	-6900	40	-6936	40	-7024	41	-7199	42
	complexe sérum albumine vit. C	-6497	37	-6321, 7	35, 6	-7375	43, 9	-7199, 8	42, 5
20 ° C	native	-6848	39, 7	-6936	40	-7199, 8	42, 5	-7463	44
	complexe sérum albumine vit. C	-6233, 9	34	-6848	39, 7	-7551	45	-7551	45

Variations du pouvoir rotatoire spécifique et de l'hélicité α en fonction du pH et de la température. (sérum albumine 0, 5 g/l. vitamine C 2, 5 x 10^{-3}M).

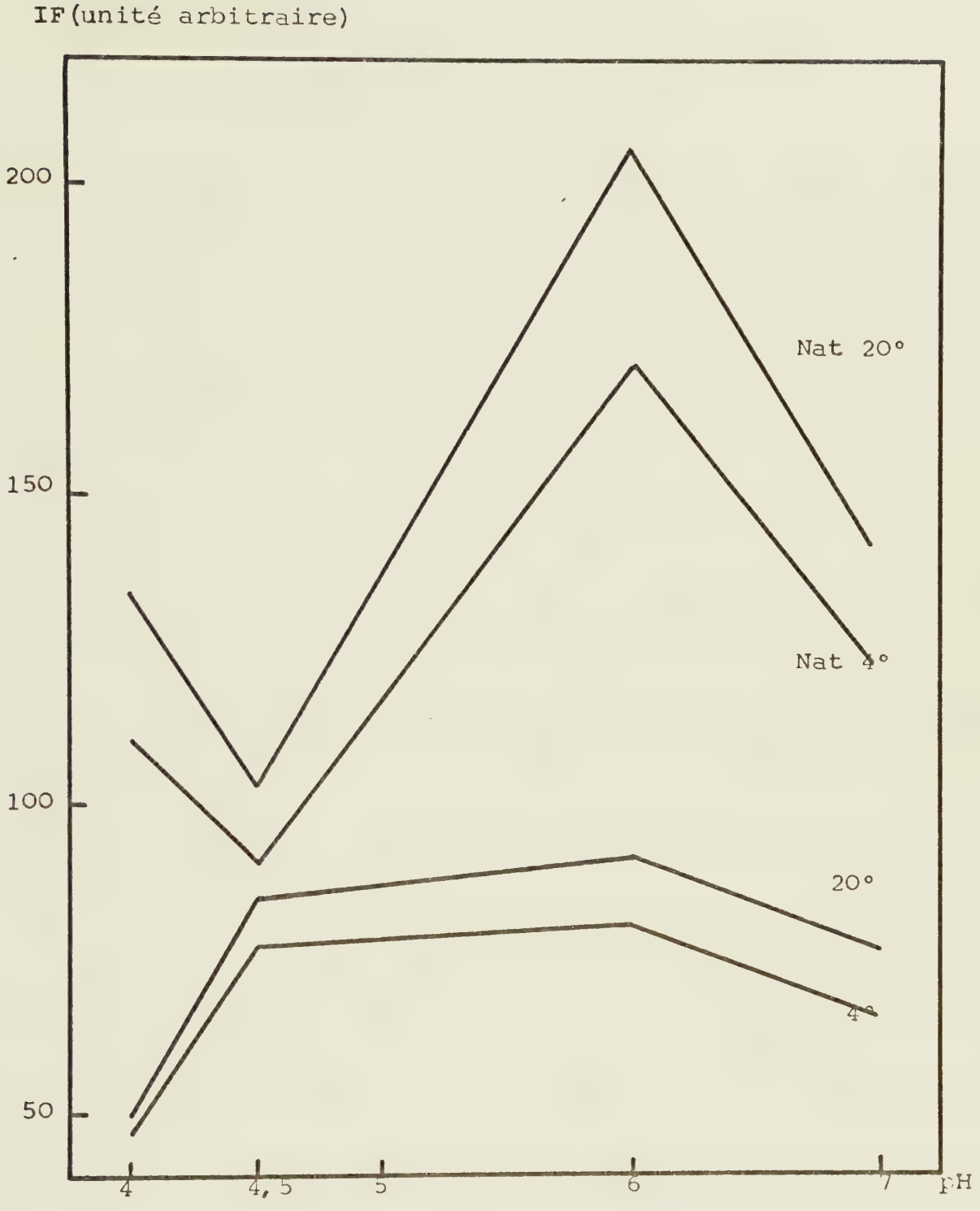


Fig. 7- Variations comparées en fonction de la température et du pH du maximum de l'intensité de fluorescence de la sérum albumine avant et après fixation d'acide ascorbique (unités arbitraires).
Sérum albumine à 0, 5 g/litre ; acide ascorbique 2, 5 x 10^{-3}M.

marquée que la quantité d'acide ascorbique fixée est importante. Cette décroissance est par conséquent plus marquée à la température de 20°C qu'à 4°C.

VII- Effet de la salinité du milieu.

Rappelons que jusqu'à présent le pH était ajusté avec la quantité minimale nécessaire de NaOH ou HCl dilué. Etant donné que la sérum albumine utilisée est elle même préalablement dessalée, la force ionique du milieu était donc toujours très faible et de ce fait pratiquement négligeable dans un domaine appliqué.

Afin de connaître et de mesurer l'effet de la salinité sur la fixation de la vitamine C sur la sérum albumine, les investigations sont maintenant menées en présence de concentrations croissantes de divers sels.

Le but pratique recherché est de savoir :

---S'il est préférable d'effectuer les fixations en l'absence ou en présence de sels.

---Si l'amplitude de la fixation varie en présence de concentratons croissantes de ces sels.

---Si les quantités de ligand fixées en un milieu privé de sel sont intégralement maintenues sur leur support protéique lorsque l'on augmente la salinité et que le pH varie.

7-1- Fixation en présence de concentrations croissantes de NaCl.

L'expérimentation conduite aux divers pH de fixation 4,0 - 4,5 - 6,0 et 7,0, est effectuée en présence d'une concentration finale uniforme tant en sérum albumine (0,5 g/litre) qu'en acide ascorbique ($2,5 \times 10^{-3}$ M) et à la température ambiante.

Cinq essais comparatifs sont prévus pour des molarités de 0,0 - 0,05M - 0,1M - 0,25M et 0,5M en NaCl.

La solution de la sérum albumine et celle d'acide ascorbique sont préalablement amenées à la même concentration saline avant d'être mélangées.

Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau VIII et Fig. 8.

Tableau VIII-

pH	Expression de la fixation	Concentration en NaCl			
		0,05M	0,1M	0,25M	0,5M
4,0	IFP	24	24	8	2,4
	moles d'ac. ascorbique/mole de protéine	91,3	91,3	30,4	9,1
4,5	IFP	20	20	10,4	1,6
	moles d'ac. ascorbique/mole de protéine	76	76	39,5	6
6,0	IFP	18	10	6,4	5,2
	moles d'ac. ascorbique/mole de protéine	68,5	38	24,3	19,8
7,0	IFP	16	16	13,6	8
	moles d'ac. ascorbique/mole de protéine	61	61	50,2	30,4

Variations de la fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine en fonction de la concentration saline et du pH. (sérum albumine 0,5 g/litre - vitamine C $2,5 \times 10^{-3}$ M - Température 20°C.)

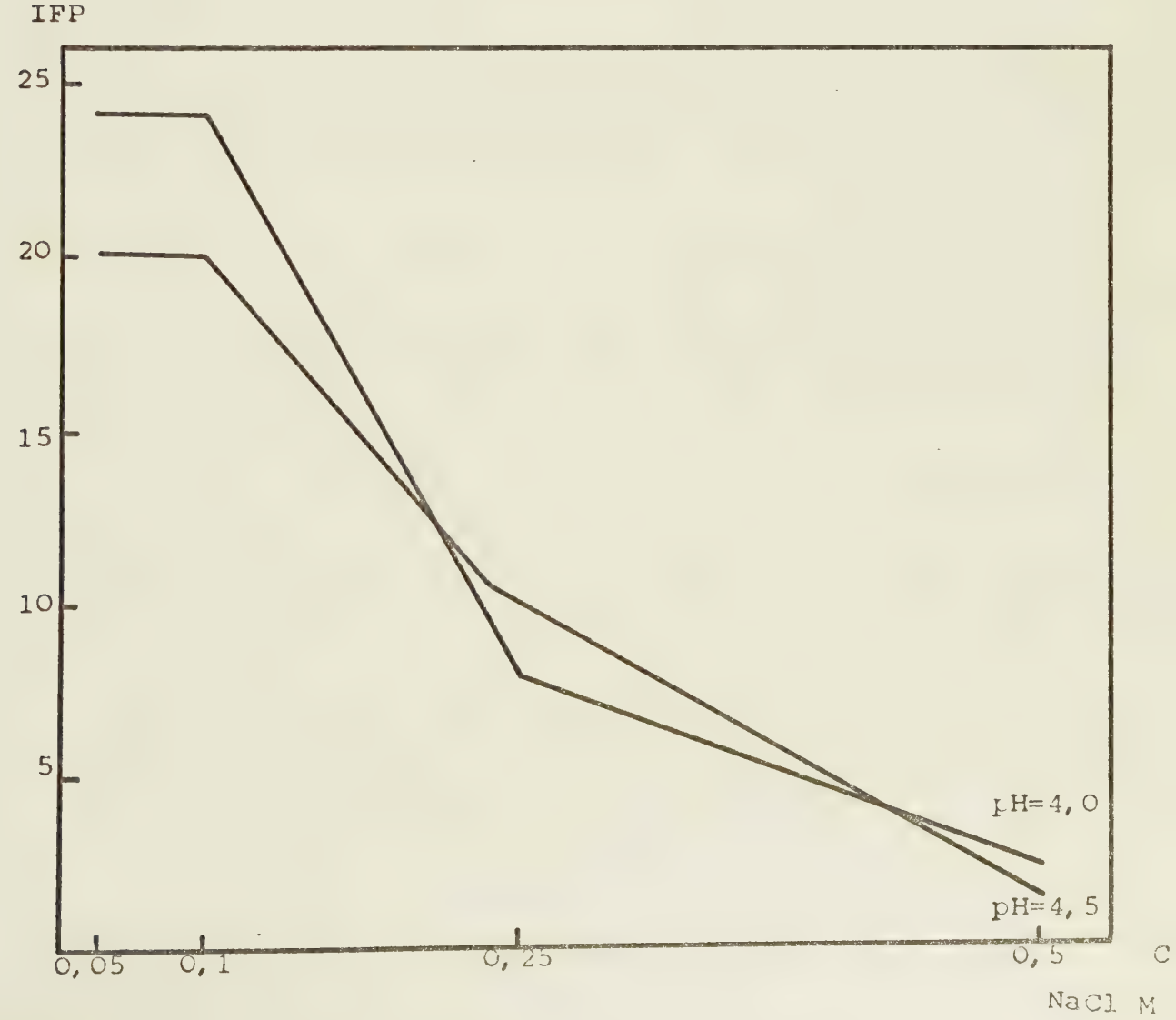


Figure 8- Légende p. 49.

Conclusion.

L'étude des résultats obtenus montre que :
- Quel que soit la concentration saline étudiée, on constate toujours une fixation d'acide ascorbique.
- Pour un même pH l'importance de la fixation décroît au fur et à mesure qu'augmente la concentration saline.
- Dans la limite des pH étudiés, l'inhibition partielle de la fixation dont est responsable la salinité est minimale à pH 7,0.

7-2- Etude spectropolarimétrique.

Nous avons vu qu'en solution non saline, la fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine se traduisait à pH 4,0 et 4,5 par une diminution de l'hélicité α, tandis qu'on notait une augmentation à pH 6,0 et 7,0. En solution saline, la présence de diverses concentrations en NaCl aux pH étudiés, n'entraîne pas de variations très sensibles de l'hélicité α de la sérum albumine.

Par contre quels que soient le pH et la concentration en NaCl, la fixation de l'acide ascorbique se traduit toujours par une diminution de l'hélicité α, calculée en fonction de l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton. (Fig. 9 - TableauIX).

7-3- Etude spectrofluorimétrique.

La fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine en milieu non salin s'accompagne d'une diminution de l'intensité de la fluorescence quel quesoi le pH, et, sauf à pH 4,0 de la fixité de la longueur d'onde du maximum de fluorescence.

La présence de NaCl dans le milieu entraîne quelques modifications.

- Dans un milieu salin, en l'absence d'acide ascorbique et quel que soit le pH, l'intensité de fluorescence augmente lorsque croît la concentration en NaCl.

- Pour une valeur donnée du pH et de la concentration saline, l'intensité de fluorescence du complexe sérum albumine + acide ascorbique est toujours plus faible que celle de la sérum albumine native.

Tableau IX-

pH	concentrations salines	sérum albumine native		complexe sérum albumine + vitamine C	
		$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %
4, 0	0, 05M	-6760	39	-6321	35, 6
	0, 1M	- 6936, 4	40	-6110, 2	33, 9
	0, 25M	-7024	41	-6497, 3	37
	0, 5M	-7463	44, 6	-6321, 7	35, 6
4, 5	0, 05M	-7551	45, 2	-6497, 3	37
	0, 1M	-7199, 8	42, 5	-6146, 1	34, 2
	0, 25M	-7400	44	-7199, 8	42, 5
	0, 5M	-7340	43, 6	-7287, 6	43, 2
6, 0	0, 05M	-7024, 2	41	-6848, 5	39, 7
	0, 1M	-7375, 4	44	-7024	41
	0, 25M	-6672, 9	38, 2	-6497, 3	36, 9
	0, 5M	-7400	44	-7199, 8	42
7, 0	0, 5M	-7726, 2	46, 6	-7375, 4	44
	0, 1M	-7814	47, 5	-7287, 6	43
	0, 25M	-7551	45, 2	-6672	39
	0, 5M	-7551	45, 2	-6848, 6	39, 7

Variations du pouvoir rotatoire spécifique à 233 nm et de l'hélicité α en fonction de la concentration saline et du pH. (Sérum albumine à 0, 5 g/l. Acide ascorbique 2, 5 x 10^{-3}M Température 20°C.)

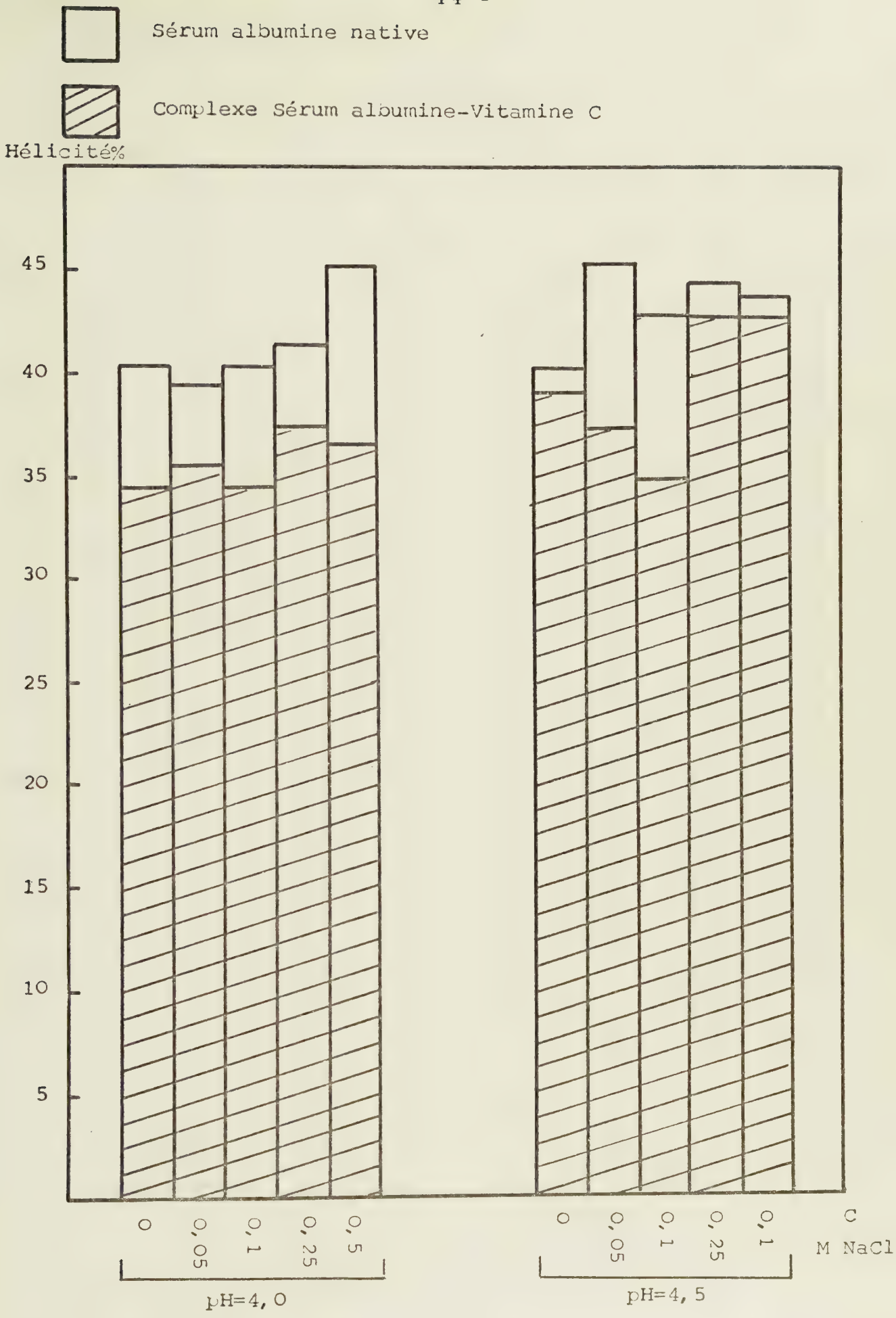


Figure 9- a- Légende p. 49.

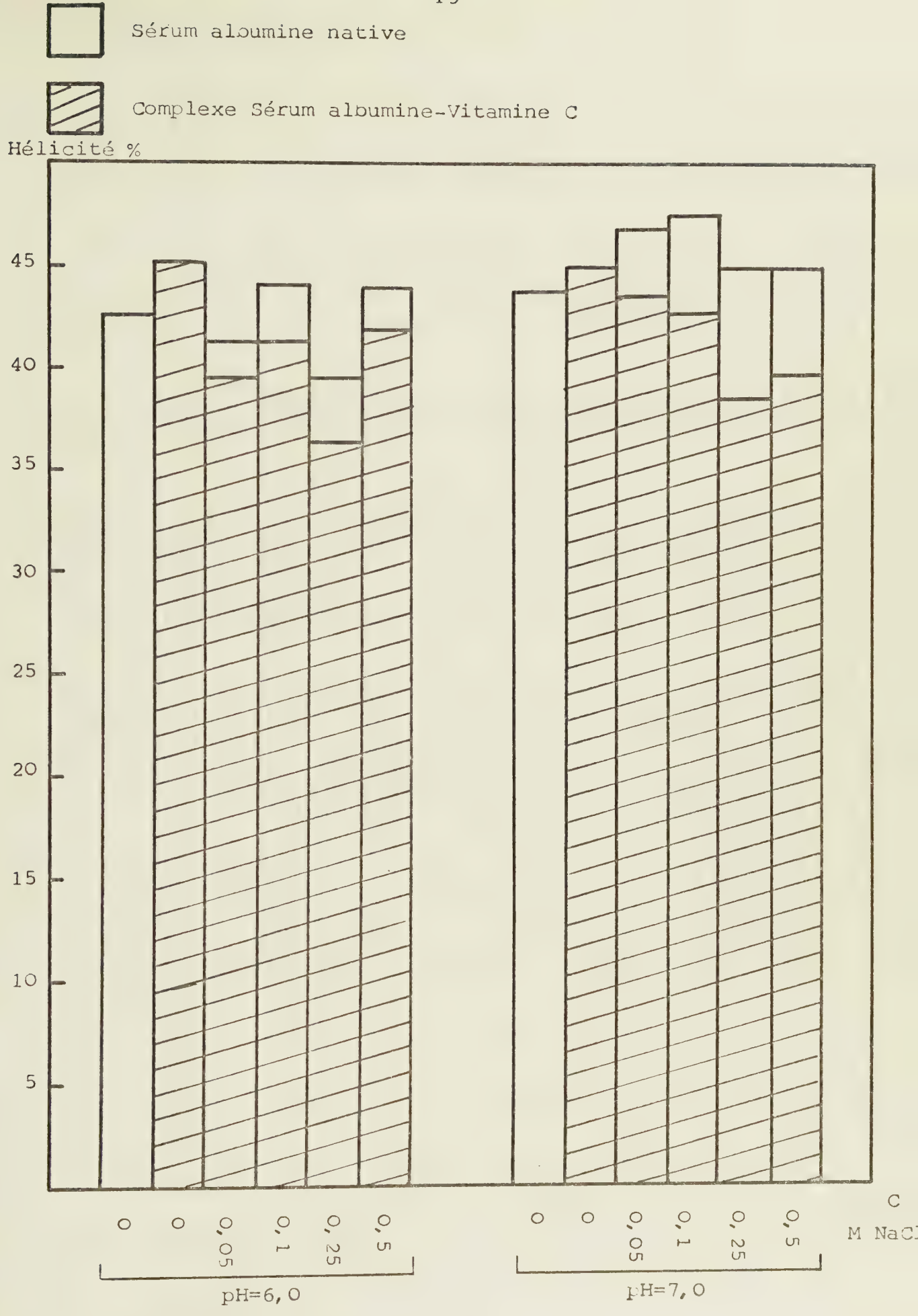


Figure 9-b- Légende p. 49.

- Une certaine variabilité de λ maximum de fluorescence se manifeste pour les différents pH et concentration en NaCl.

- Pour une valeur donnée du pH, l'intensité de fluorescence du complexe sérum albumine + acide ascorbique augmente lorsque croît la concentration saline, c'est-à-dire lorsque décroît la quantité d'acide ascorbique fixé (fig. 10).

VIII- Effet d'un contact préalable de la sérum albumine avec NaCl sur le niveau de fixation de l'acide ascorbique.

Jusqu'à présent nous avons étudié la fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine en milieu salin. Le protocole expérimental impliquait que les solutions protéiques et celles d'acide ascorbique qui étaient mélangées pour réaliser le milieu où s'effectue la fixation du ligand présentaient une même concentration saline.

Il est cependant apparu qu'en modifiant ce protocole expérimental, c'est-à-dire en imprégnant d'abord de sel la sérum albumine, la quantité de ligand fixée différait de celle attendue en fonction de la quantité totale de sel finalement présente dans le mélange des solutions de sérum albumine et d'acide ascorbique.

Une étude systématique a donc été réalisée de la façon suivante. Si la concentration finale de NaCl prévue dans le milieu est C, la concentration de sel dans la solution de sérum albumine sera 2C, tandis qu'elle sera nulle dans la solution d'acide ascorbique. Après leur préparation, ces solutions salines de sérum albumine demeurent 1/2 heure au repos avant d'être mélangées à la solution de ligand.

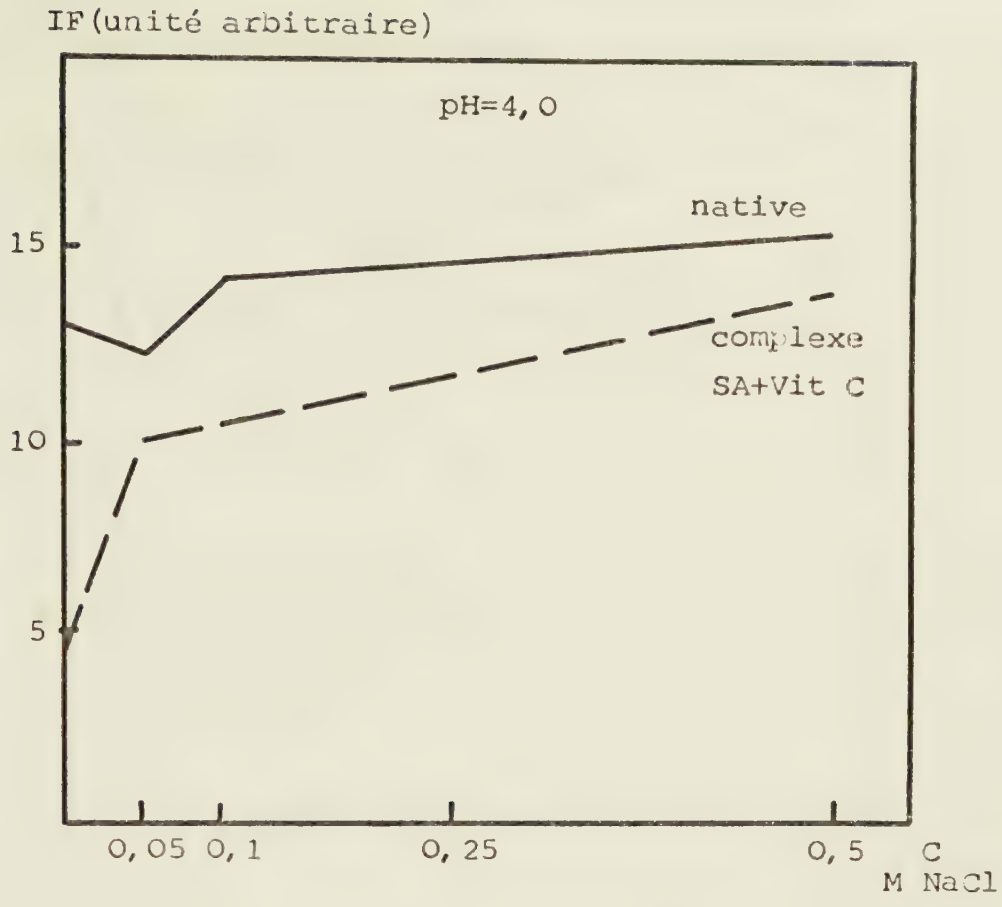
——— 8-1- Conditions expérimentales.

Une solution de sérum albumine à 1g/l. est réalisée dans un milieu renfermant :

0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 mole NaCl / litre.

La solution de vitamine C qui sera mélangée à volume égal est 5×10^{-3} Molaire.

Les concentrations finales du mélange



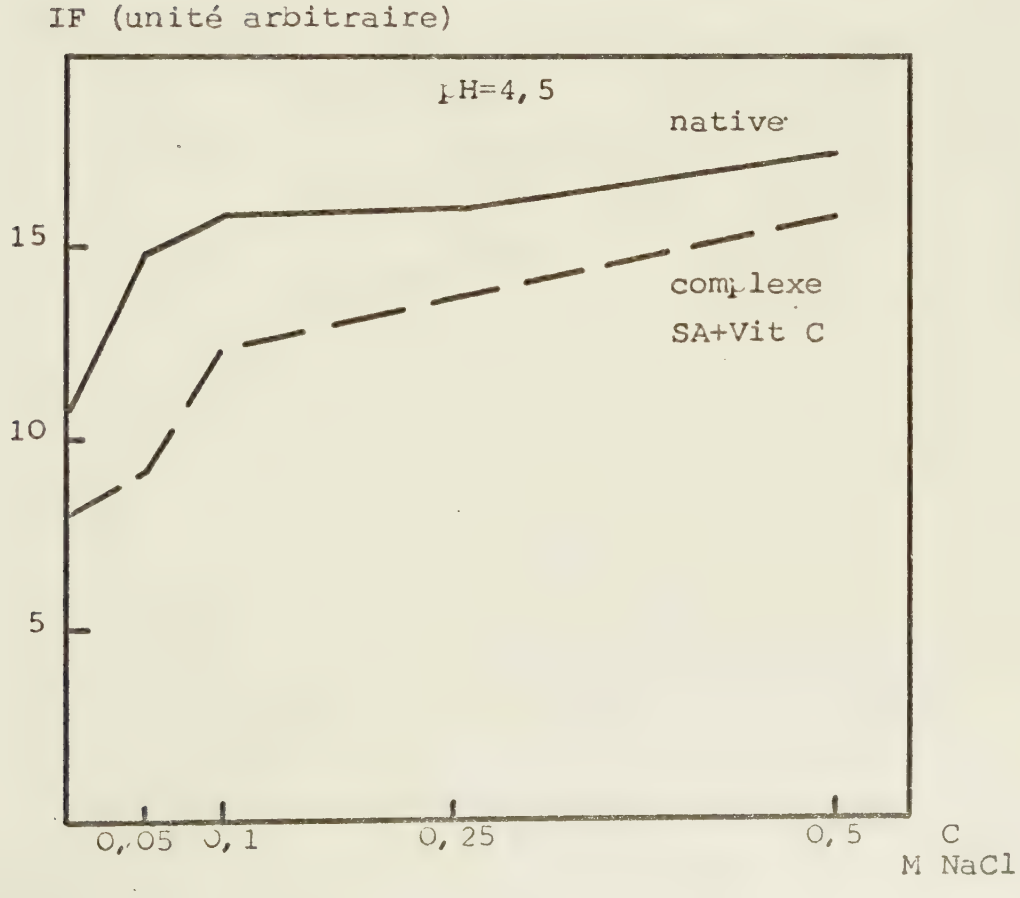
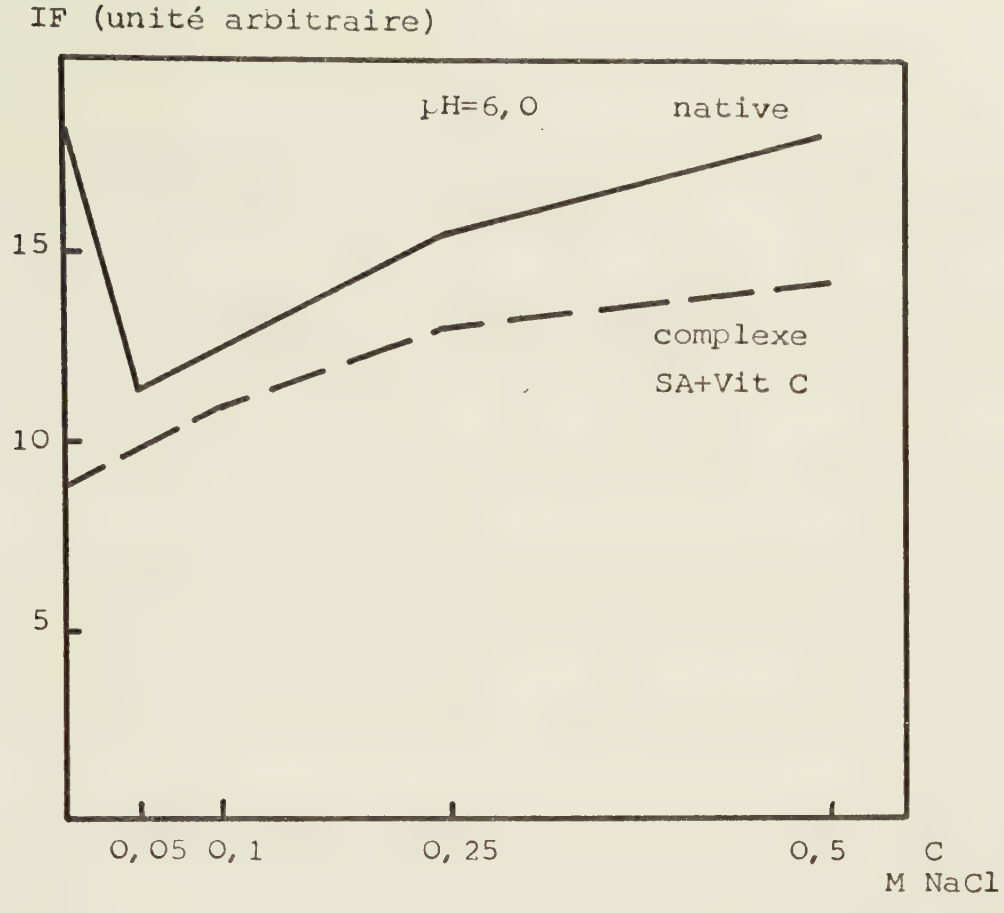


Figure 10-a- Légende p. 49.



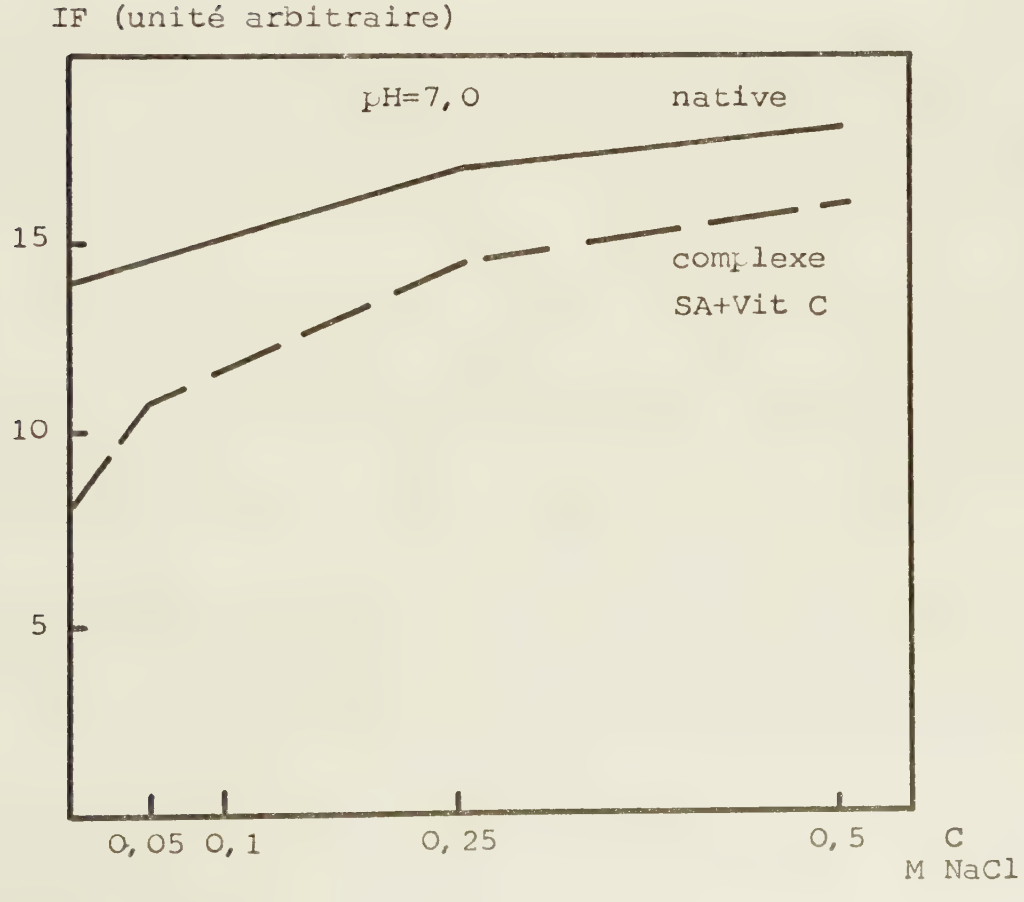


Figure 10-b- Légende p. 49.

Légende figure 8- Variations de l'IFP en fonction de la concentration saline et du pH. Sérum albumine à 0,5 g/l acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M. Température 20°C.

Légende figure 9a-Variations comparées de l'hélicité α de la sérum albumine avant et après fixation de l'acide ascorbique en fonction de la concentration saline et du pH du milieu ambiant.
Sérum albumine à 0,5 g/litre. acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M. Température 20°C.

Légende figure 9b- Variations comparées de l'hélicité α de la sérum albumine avant et après fixation de l'acide ascorbique en fonction de la concentration saline et du pH du milieu ambiant.
Sérum albumine à 0,5 g/l. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M Température 20°C.

Légende figure 10a-Variations comparées en fonction de la concentration saline et du pH, du maximum d'intensité de fluorescence (unités arbitraires) de la sérum albumine avant et après la fixation de l'acide ascorbique . Sérum albumine à 0,5 g/litre. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M - Température 20°C.

Légende figure 10b- Variations comparées en fonction de la concentration saline et du pH, du maximum d'intensité de fluorescence (unités arbitraires) de la sérum albumine avant et après la fixation de l'acide ascorbique Sérum albumine à 0,5 g/litre. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M Température 20°C.

Légende figure 12a- 12b- Variations comparées en fonction de la concentration saline initiale et du pH, du maximum de l'intensité de fluorescence (unités arbitraires) de la sérum albumine préalablement mise au contact d'une solution saline deux fois plus concentrée que la concentration finale avant d'être placées au contact de la solution d'acide ascorbique en solution non saline.

Légende figure 14- Variations de l'IFP demeurant fixées sur la sérum albumine après addition de diverses concentrations salines et à différents pH. Concentration initiale en acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M. Température 20°C

seront donc :

0,05 - 0,1 - 0,25 - 0,5M en NaCl et $2,5 \times 10^{-3}$M en acide ascorbique.
Comme précédemment, l'expérimentation est effectuée à divers pH.

8-2- Résultats.

Ils montrent (tableau X et figure 11) que, par rapport aux résutats du tableau VIII, le léger saumurage auquel est préalablement soumise la sérum albumine a une répercussion considérable sur le niveau de la fixation en fonction de la concentration saline initiale.

- Pour chaque valeur du pH et quelle que soit la concentration saline finale, la quantité d'acide ascorbique fixée semble ici indépendante de cette concentration.

- Il faut toutefois noter que la fixation devient moins importante quand le pH augmente, ce qui avait été déjà constaté lorsque l'on mélangeait des solutions isohyalines Ce n'est donc pas la concentration finale du milieu en NaCl qui conditionne l'importance de la fixation, mais semble-t-il la concentration initiale de ce sel au contact de la sérum albumine.

8-3- Etude spectropolarimétrique.

Etant donné que dans la plupart des cas la fixation de l'acide ascorbique n'a plus la même valeur lorsqu'on laisse préalablement la protéine au contact d'une solution de NaCl dont la concentration est double de la concentration finale, on peut en déduire que les site de fixation ne sont pas occupés de la même façon dans ces deux cas par Na^+, Cl^- et l'acide ascorbique.

Il était donc intéressant de procéder à une étude structurale comparée afin de vérifier si le contact préalable avec NaCl et la fixation ultérieure d'acide ascorbique dissous dans l'eau distillée entraînaient des modifications de l'hélicité α de la sérum albumine différentes de celles résultant du mélange de solutions isohyalines de protéine et de ligand.

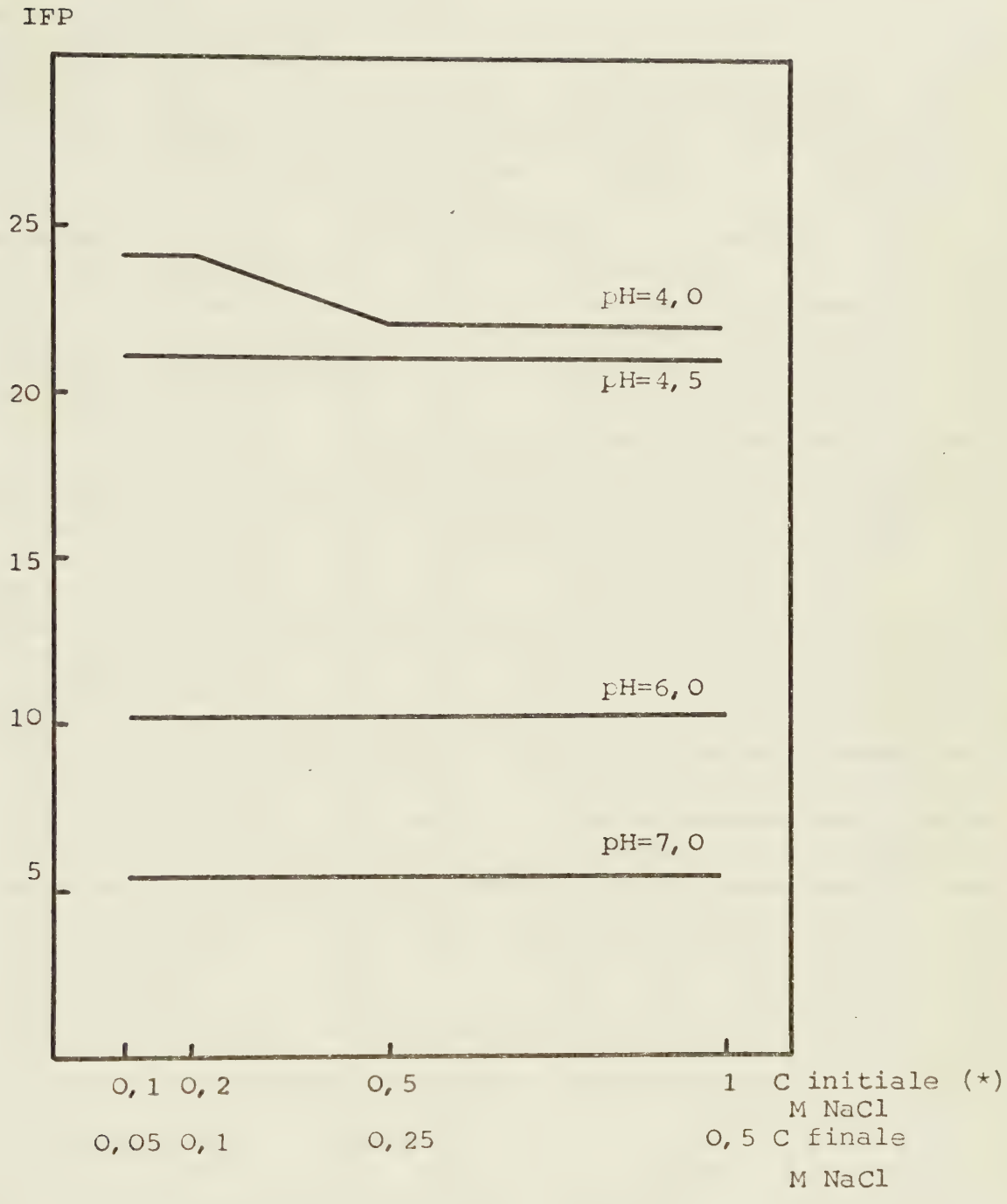
Les résultats rassemblés dans le tableau XI ne mettent en évidence que des variations mineures par rapport à celles précédemment notées. (tableau IX).

Tableau X -

pH	Expression de la fixation	Concentrations salines initiales (.) NaCl			
		0, 1M	0, 2M	0, 5M	1M
4, O	IFP	24	24	22	22
	moles d'ac. ascorbique/mole desérum albumine	91, 8	91, 3	83, 7	83, 7
4, 5	IFP	20, 8	20, 8	20, 8	20, 8
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	79	79	79	79
6, 0	IFP	10, 4	10, 4	10, 4	10, 4
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	39, 5	39, 5	39, 5	39, 5
7, 0	IFP	5, 6	5, 6	5, 6	5, 6
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	21, 3	21, 3	21, 3	21, 3

(.) Les concentrations finales en équilibre avec le complexe sérum albumine + acide ascorbique sont deux fois plus faibles.

Variations de la fixation de l'ac. ascorbique sur la sérum albumine en fonction de la concentration initiale de NaCl des solutions protéiques à divers pH.



(*). La concentration finale du milieu où se forme le complexe ascorbique est deux fois plus faible.

Figure 11- Variations de l'IFP de l'acide ascorbique sur la sérum albumine en fonction de la concentration saline initiale des solutions protéiques à divers pH.

Tableau XI-

pH	concentrations salines initiales(.)	Sérum albumine native		complexe sérum albumine + acide ascorbique	
		$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %
4, 0	0, 1M	-6936, 4	40	-6497, 3	37
	0, 2M	-7024, 2	41	-6497, 3	37
	0, 5M	-7400	44	-6233, 9	35
	1 M	-7463	44, 5	-6321, 7	35, 6
4, 5	0, 1M	-7199	42, 5	-6673	38, 5
	0, 2M	-7400	44	-7024	41
	0, 5M	-7340	43, 6	-6673	38, 5
	1M	-7400	44	-6585	37, 6
6, 0	0, 1M	-7199	42	-6848, 5	39, 7
	0, 2M	-7387	43	-7200	42, 5
	0, 5M	-6760	39	-6936	40
	1M		45	-7375	43
7, 0	0, 1M	-7800	47	-7112	41, 8
	0, 2M	-7551	45, 2	-7024	41
	0, 5M	-7551	45, 2	-7287, 6	43, 2
	1M	-7500	45	-7300	44

(.) Les concentrations salines finales en équilibre avec le complexe sérum albumine + acide ascorbique, sont deux fois plus faibles.

Variations du pouvoir rotatoire spécifique à 233 nm et de l'hélicité α en fonction des concentrations salines initiales de la solution protéique et du pH. (Sérum albumine à 0, 5 g/litre - acide ascorbique $2, 5 \times 10^{-3}$M. Température + 20° C).

——— - 8-4- Etude spectrofluorimétrique.

Pour des raisons analogues à celles qui viennent motiver la précédente étude structurale, on a présentement recherché les éventuelles modifications de la fluorescence de la sérum albumine préalablement placée au contact de solutions de NaCl à différentes concentrations avant la fixation de l'acide ascorbique dissous dans l'eau distillée par rapport à la fluorescence résultant d'un mélange ishyalin de sérum albumine et d'acide ascorbique.

Quel que soit le pH et la concentration saline, on constate (fig. 12) une diminution de l'intensité de fluorescence par rapport à celle du témoin sans acide ascorbique. Cette diminution est toutefois plus faible que celle constatée lorsque l'on avait mélangé des solutions isohyalines (cf. fig. 10).

Elle est en accord avec le fait déjà constaté que moins il y a de ligand fixé, moins la fluorescence de la protéine native se trouve inhibée.

IX- Résistance du complexe sérum albumine + acide ascorbique en présence de NaCl.

En milieu non salin, lorsque l'on a réalisé une fixation d'acide ascorbique sur la sérum albumine, une dialyse contre de l'eau permet, avons-nous vu, d'éliminer l'acide ascorbique non fixé. Par conséquent, les molécules de ligand liées à la sérum albumine le demeurent en dépit du contact d'un grand excé de solvant pur.

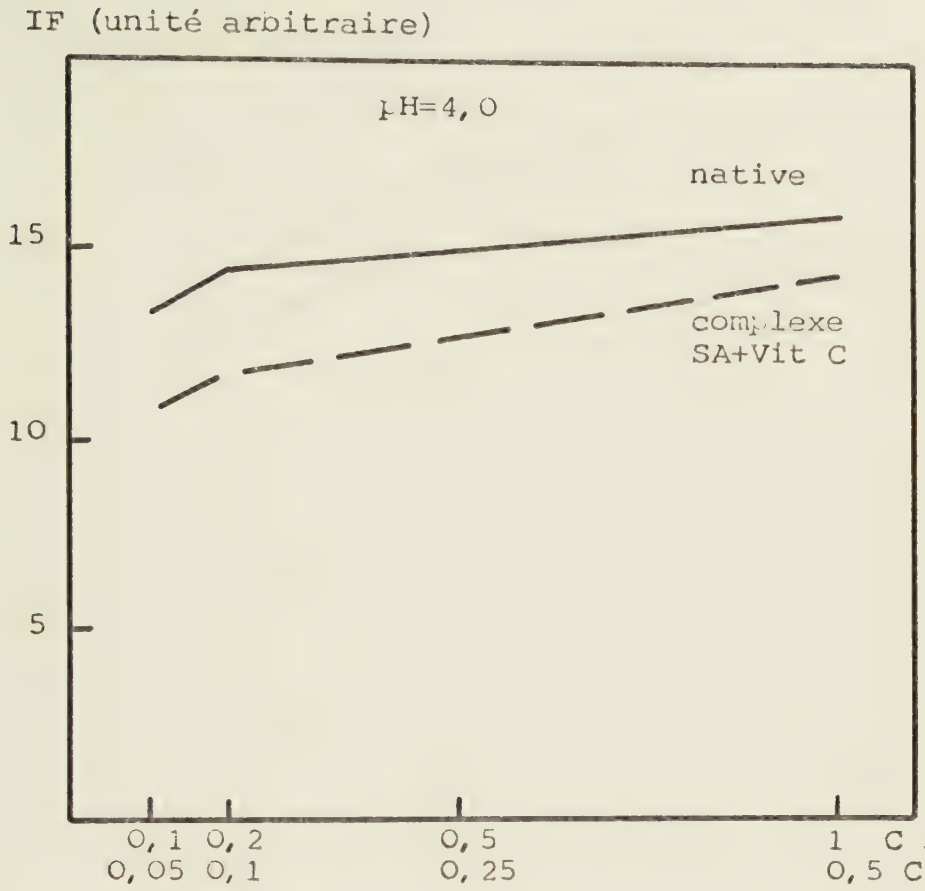
D'un autre côté, la présence de sel dans le milieu renfermant la protéine et son ligand diminue la fixation de ce dernier par rapport au niveau atteint en milieu non salin.

La question se pose donc de savoir si des molécules de ligand irréversiblement fixées en milieu non salin peuvent se détacher de la protéine lorsque le complexe protéine + ligand est placé en solution saline.

——— 9-2- Conditions expérimentales.

Comme précédemment la vitamine C est

Figure 12-a- Légende p. 49.



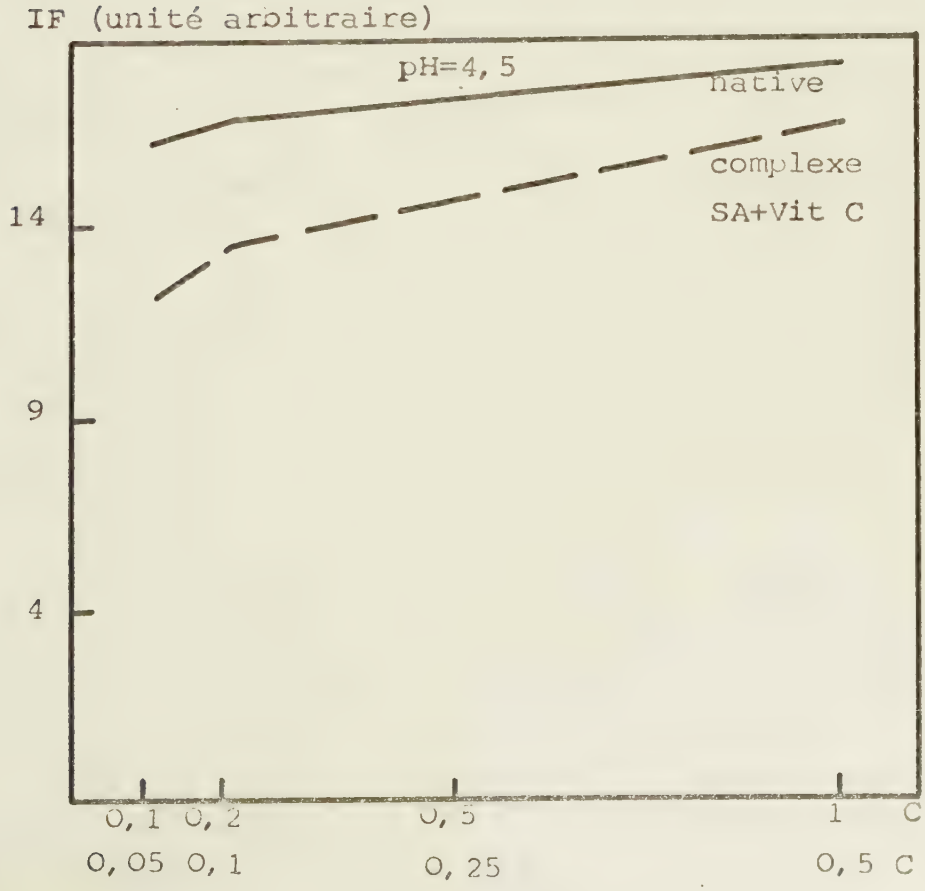
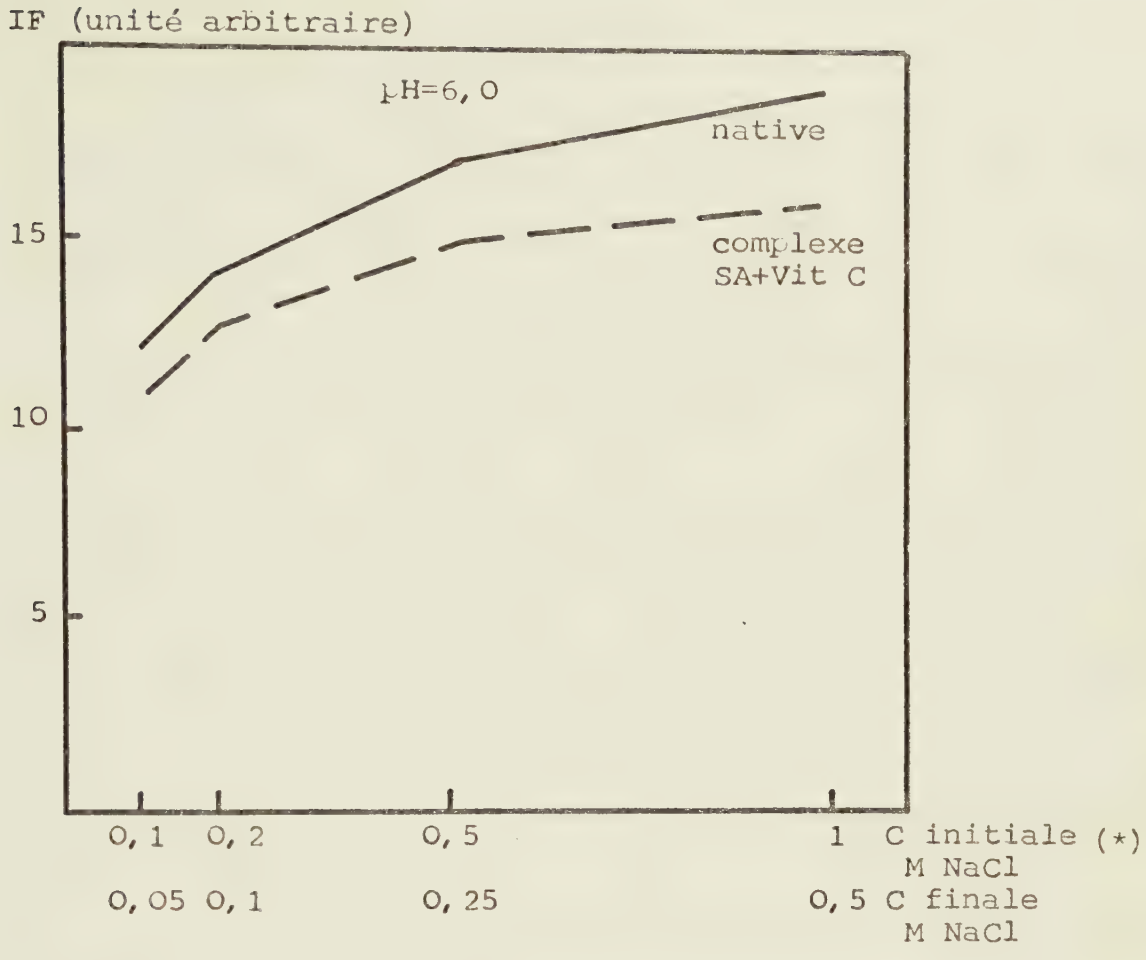
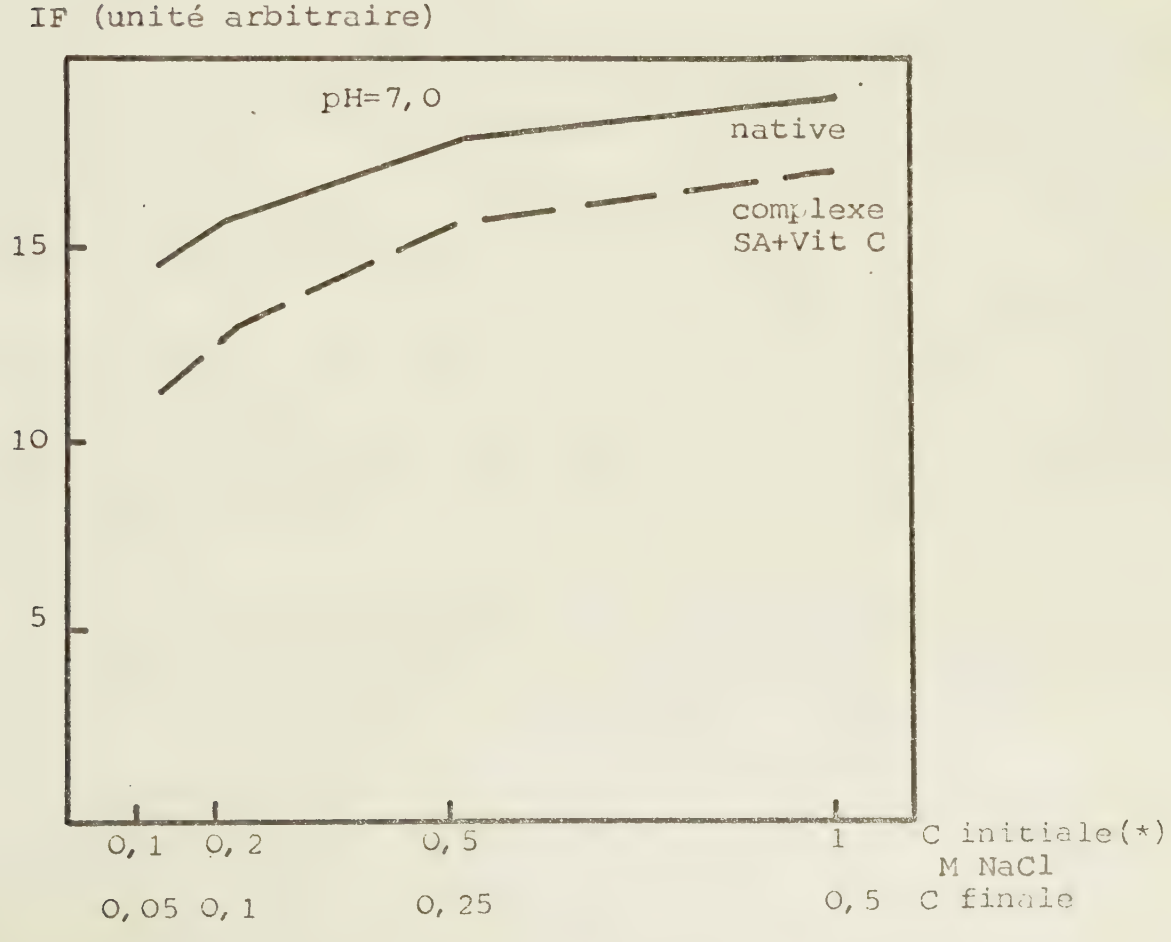


Figure 12-b- Légende p. 49.





fixée sur la sérum albumine, le solvant étant l'eau distillée, bouillie et refroidie sous azote puis amenée au pH voulu.

Après incubation et dialyse, on ajoute dans le dialyseur une solution de NaCl à différents pH et à différentes concentrations.

On dialyse de nouveau pendant 10 heures contre 200 ml de solution NaCl aux mêmes concentrations et pH que ceux du dialyseur.

L'acide ascorbique éventuellement détaché de la sérum albumine passe dans le dialysat où il est dosé spectrophotométriquement.

Pour la réalisation pratique, on a utilisé une solution non saline de sérum albumine à concentration constante de 1g/litre et des solutions non salines également d'acide ascorbique aux concentrations de $2,5 \times 10^{-3}$M - 5×10^{-3}M et 2×10^{-2}M. Ces solutions amenées au pH voulu sont mélangées volume à volume ; les concentrations finales sont donc moitié moindres que celles indiquées ci-dessus.

Après élimination de l'excés d'acide ascorbique, chaque solution de complexe est mélangée à un volume égal de solution saline de concentration initiale 0,25 - 0,5 - 1M.

La concentration finale est donc de 0,250 en sérum albumine et 0,125 - 0,25 - 0,5M en NaCl dans chaque série expérimentale.

A l'intérieur de chacune de ces séries, le pH a été amené à 4,0 - 4,5 - 6,0 et 7,0. Toutes les opérations sont menées à la température ambiante (+ 20°C).

9-3- Résultats.

De l'examen des résultats exposés dans les tableaux XII, XIII et XIV, il ressort que :

Quelle quesoit la quantité de ligand fixée à la sérum albumine en milieu non salin et la valeur du pH de ce milieu, l'addition de NaCl aux concentrations étudiées entraîne toujours le départ d'une partie du ligand.

- Pour une même valeur du pH, le nombre des molécules qui se séparent ainsi du support protéique est d'autant plus élevé que la concentration saline est élevée.

Tableau XII.

pH	Expression des quantités demeurant fixées	Concentrations finales en NaCl			
		0 (.)	0, 125 M	0, 25 M	0, 5 M
4, 0	IFP	14, 5	13, 6	13, 4	13, 2
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	55, 1	51, 7	51	50, 2
4, 5	IFP	12	11, 2	11, 2	11, 2
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	45, 56	42, 5	42, 5	42, 5
6, 0	IFP	22	20, 8	20, 4	20
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	83, 7	79	77, 6	76
7, 0	IFP	18	16	15	12
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	68, 5	61	57	45, 56

(.) Les chiffres de cette colonne indiquent l'importance de la fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine avant que, dans un deuxième temps on place le complexe sérum albumine + acide ascorbique en solution saline aux concentrations indiquées en tête des trois solonnes de droite.

Variations des quantités d'acide ascorbique demeurant fixées sur la sérum albumine après addition de diverses concentrations salines et à différents pH. Concentration en acide ascorbique finale $1,25 \times 10^{-3}$ M. Température à +20°C.

Tableau XIII-

pH	Expression des quantités demeurant fixées	Concentrations finales en NaCl			
		0 (.)	0, 125M	0, 25M	0, 5M
4, 0	IFP	24	21, 6	20, 8	20, 4
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	91, 3	82, 2	79	77, 6
4, 5	IFP	20	18,4	17	17
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	76	70, 4	64, 7	64, 7
6, 0	IFP	32	20	16, 4	16
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	121, 8	76	62, 4	61
7, 0	IFP	26	13, 6	10, 8	9, 6
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	99	51, 7	41	36, 5

(.) Les chiffres de cette colonne indiquent l'importance de la fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine avant que, dans un deuxième temps on place le complexe sérum albumine + acide ascorbique en solution saline aux concentrations indiquées en tête des trois colonnes de droite.

Variations des quantités d'acide ascorbique demeurant fixées sur la sérum albumine après addition de diverses concentrations salines et à différents pH. Acide ascorbique finale $2,5 \times 10^{-3}$ M. Température +20°C.

Tableau XIV-

pH	Expression des quantités demeurant fixées	Concentrations finales en NaCl			
		0 (.)	0,125M	0,25M	0,5M
4,0	IFP	80	67,2	66	60
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	304	255,8	251,4	228
4,5	IFP	76	66	65	60
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	289,3	251,4	247,4	228
6,0	IFP	80	67,2	61,2	54
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	304	255,8	233	205,5
7,0	IFP	52	30	28	24,2
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	198	114	106,5	92,1

(.) Les chiffres de cette colonne indiquent l'importance de la fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine avant que, dans un deuxième temps on place le complexe sérum albumine + acide ascorbique en solution saline aux concentrations indiquées en tête des trois colonnes de droite.

Variations des quantités d'acide ascorbique demeurant fixées sur la sérum albumine après addition de diverses concentrations salines et à différents pH. Concentration finale en acide ascorbique 10^{-2}M. Température +20°C.

- Pour une même valeur de la salinité et du pH, ce nombre est d'autant plus important que la quantité de ligand primitivement fixé était elle-même plus élevée (fig. 13 - 14 - 15).

- Une même concentration saline détache une proportion d'autant plus importante de ligand que l'on s'éloigne du voisinage du point isoélectrique.

- Sur le plan de la réalisation pratique, il est donc plus rationnel si l'on doit finalement se trouver en milieu salin de procéder à la fixation en milieu non salin et de ne fixer que des quantités relativement faibles d'acide ascorbique puisqu'un apport ultérieur de salinité n'en détachera que des proportions mineures.

9-4- Etude spectropolarimétrique.

On a vu (tableau 5) que l'augmentation de la salinité n'entraînait qu'une augmentation mineure de l'hélicité α de la molécule de sérum albumine et que, par contre, la fixation d'acide ascorbique s'accompagnait d'une diminution de cette hélicité.

On a donc recherché si le fait de placer un complexe sérum albumine + acide ascorbique en milieu salin, ce qui entraîne un départ d'acide ascorbique s'accompagnait éventuellement de variations d'hélicité dont l'amplitude serait notoirement différente de celle à laquelle on pourrait s'attendre.

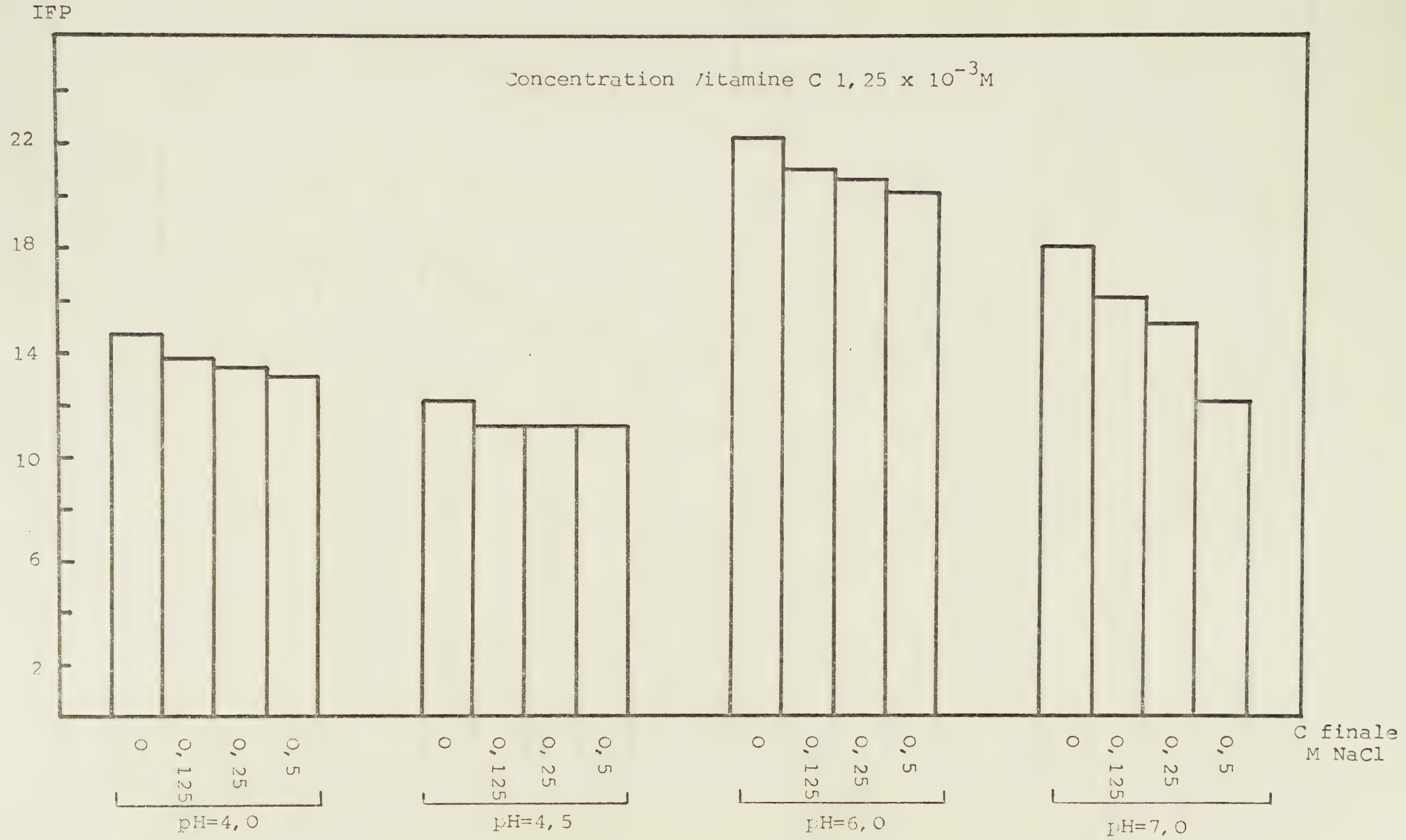
Les résultats (tableaux XV - XVI et XVII) ne mettent en évidence que les variations relativement mineures par rapport à celles constatées dans le tableau V et le tableau VI.)

9-5- Etude spectrofluorimétrique.

On a vu précédemment qu'en règle générale un accroissement de la salinité provoquait une augmentation de l'intensité de fluorescence, tandis que celle-ci diminue en fonction de la quantité d'acide ascorbique fixée et que λ maximum varie légèrement (fig. 10).

Il a donc paru intéressant de rechercher si les conditions expérimentales précisées dans les paragraphes précédents entraîneraient une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement de λ maximum particulièrement accentué.

Figure -13- Variations de l'IFP demeurant fixées sur la sérum albumine après addition de diverses concentrations salines et à divers pH. Concentration initiale en acide ascorbique $1,25 \times 10^{-3}$M. Température 20°C.



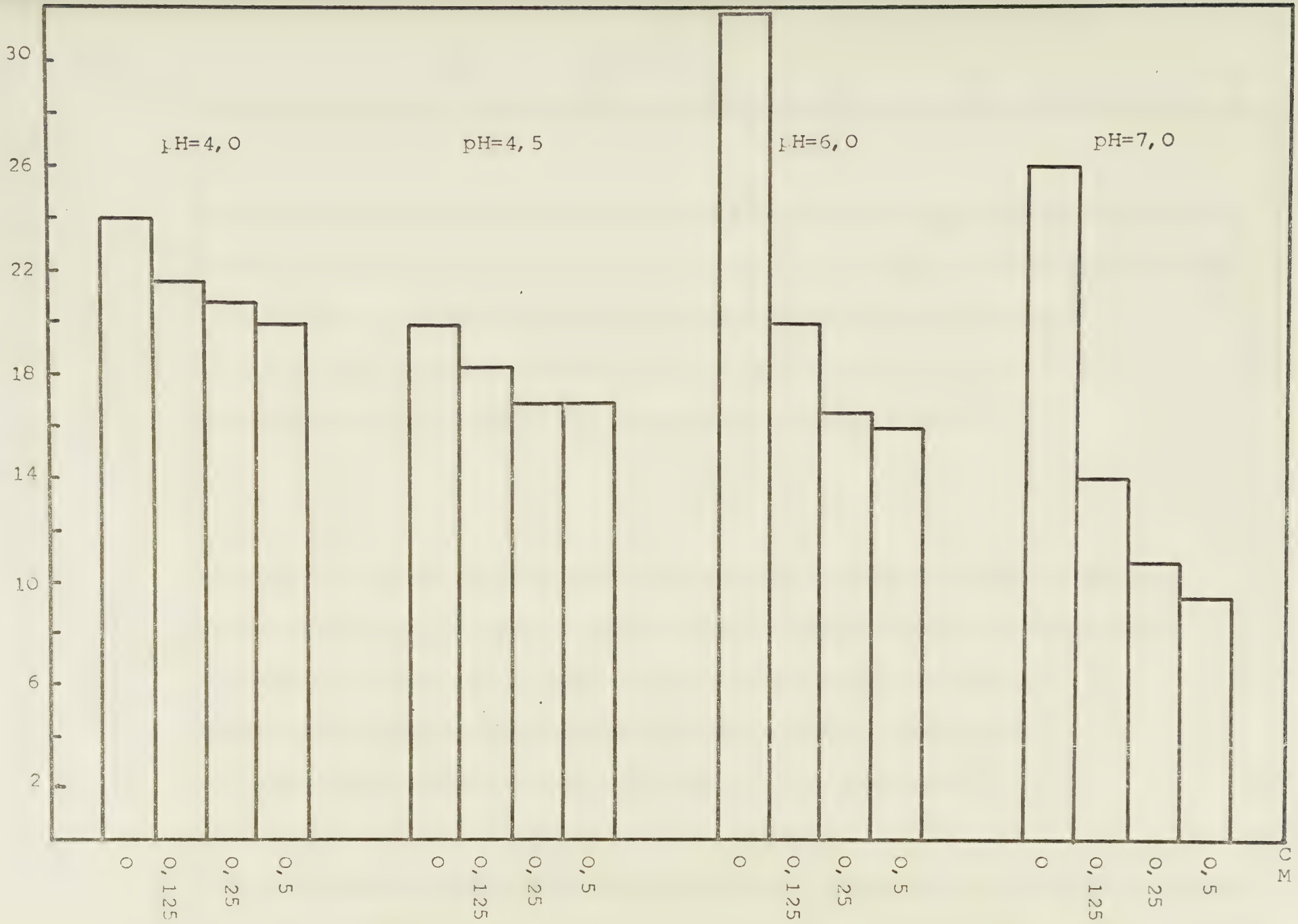

30
26
22
18
14
10
6
2
pH=4,0
pH=4,5
pH=6,0
pH=7,0
0
0,125
0,25
0,5
C finale
M NaCl

Fig. 15-a - Variations de l'IFP demeurant fixées sur la sérum albumine après addition de diverses concentrations salines et à différents pH. Concentration initiale en acide ascorbique 1 x 10^{-2}M. Température +20°C.

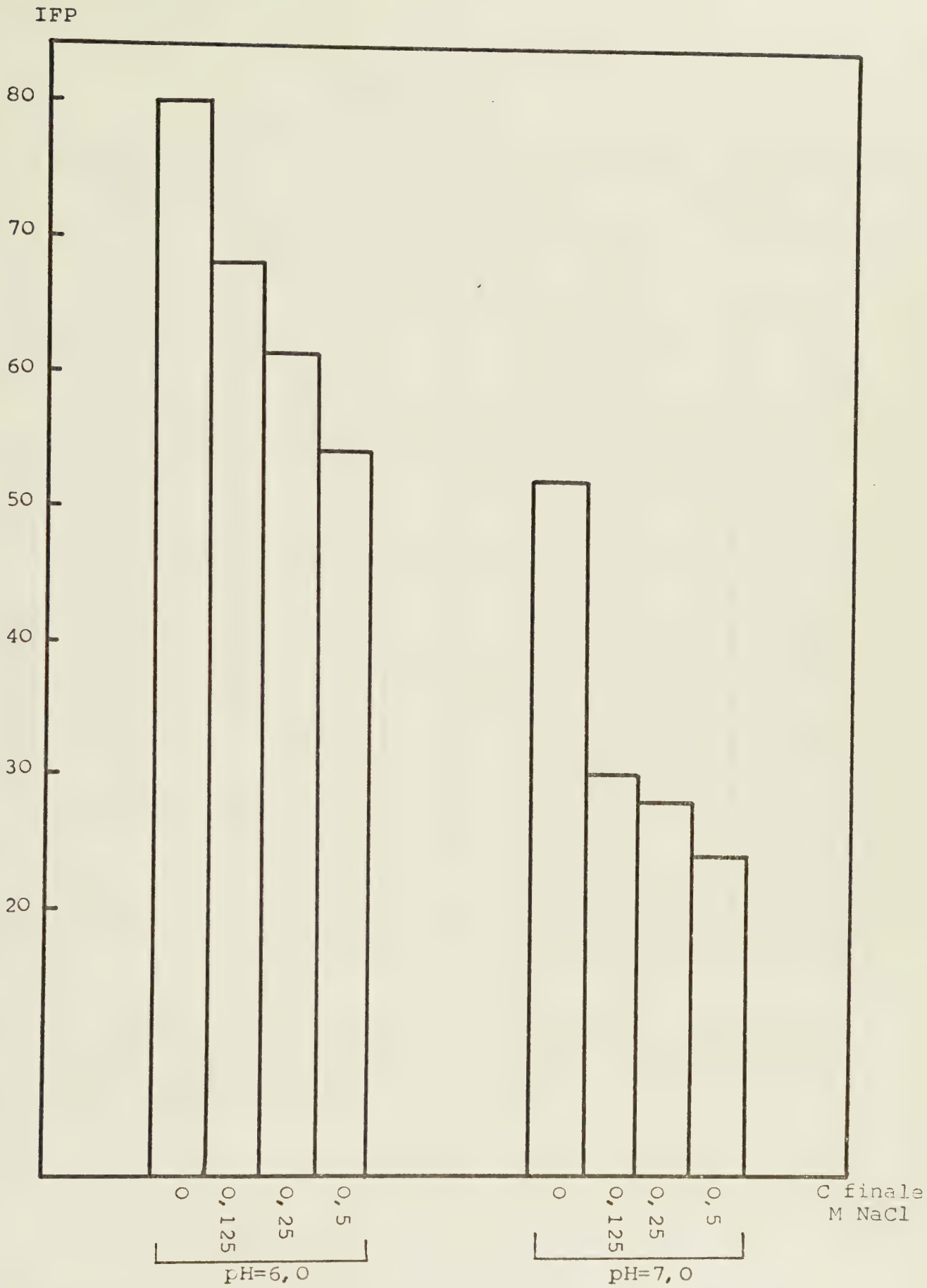


Fig. 15b- Variations de l'IFP demeurant fixées sur la sérum albumine après addition de diverses concentrations salines et à différents pH. Concentration initiale en acide ascorbique 1 x 10^{-2}M. Température +20°C.

Tableau XV-

pH	concentrations salines finales	Sérum albumine		complexe sérum albumine + vitamine C	
		$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %
4, 0	0, 125M	-6936, 4	40	-6146, 2	34
	0, 25 M	-7024, 2	41	-5970	32, 8
	0, 5 M	-7463	44, 6	-6321	35, 6
4, 5	0, 125M	-7199	42, 5	-6146, 2	34
	0, 25 M	-7400	44	-6321	35, 6
	0, 5 M	-7340	43, 6	-6321	35, 6
6, 0	0, 125 M	-7375	44	-6321	35, 6
	0, 25 M	-6672, 9	38, 2	-6760	39
	0, 5 M	-7400	44	-6199, 8	42, 5
7, 0	0, 125 M	-7814	47, 3	-6321	35, 6
	0, 25 M	-7551	45, 2	-6321	35, 6
	0, 5 M	-7551	45, 2	-7199, 8	42, 5

Les concentrations initiales en acide ascorbique sont celles qui résultent de la fixation en un milieu $1,25 \times 10^{-2}$ M en acide ascorbique.

Variations comparées du pouvoir rotatoire spécifique DOR et de l'hélicité α de solutions de sérum albumine en milieu salin et de ceux du complexe sérum albumine + acide ascorbique en un milieu salin à diverses concentrations et pH. Température +20° C.

Tableau XVI-

pH	concentrations salines	Sérum albumine native		complexe sérum albumine + vitamine C	
		$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %
4, 0	0, 125 M	- 6936	40	- 6321	35, 6
	0, 25 M	- 7024	41	- 6848	39, 7
	0, 5 M	- 7463	44, 6	- 6848	39, 7
4, 5	0, 125 M	- 7199	42, 5	- 6848	39, 7
	0, 25 M	- 7400	44	- 6673	38, 4
	0, 5 M	- 7340	43, 6	- 7199	42, 5
6, 0	0, 125 M	- 7375	44	- 6673	38
	0, 25 M	- 7024	41	- 6672	38, 2
	0, 5 M	- 7726	44, 6	- 7400	44
7, 0	0, 125 M	- 7814	47, 3	- 6848	39, 7
	0, 25 M	- 7551	45, 2	- 6673	38, 2
	0, 5 M	- 7551	45, 2	- 7199, 8	42, 5

Les concentrations initiales en acide ascorbique sont celles qui résultent de la fixation en un milieu $2,5 \times 10^{-3}$ M en acide ascorbique.

Variations comparées du pouvoir rotatoire spécifique et de l'hélicité α de solutions de sérum albumine en milieu salin et de ceux du complexe sérum albumine + acide ascorbique formé en milieu non salin et demeuré stable en un milieu salin à diverses concentrations et pH.

Tableau XVII -

pH	concentrations salines	Sérum albumine native		complexe sérum albumine + vitamine C	
		$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %
4, 0	0, 125 M	-6936	40	-6848	39, 7
	0, 25 M	-7024	41	-6673	38, 2
	0, 5 M	-7463	44, 6	-7024	41
4, 5	0, 125 M	-7199	42, 5	-6673	38, 2
	0, 25 M	-7400	44	-7024	41
	0, 5 M	-7340	43, 6	-7260	43
6, 0	0, 125 M	-7375	44	-5268	28, 2
	0, 25 M	-6673	38, 2	-5795	31, 4
	0, 5 M	-7400	44	-6497	37
7, 0	0, 125 M	-7814	47, 3	-6146, 2	34
	0, 25 M	-7551	45, 2	-5970	32, 6
	0, 5 M	-7551	45, 2	-6848	39, 7

Les concentrations initiales en acide ascorbique sont celles qui résultent de la fixation en un milieu 10^{-2} M en acide ascorbique. Température +20°C.

Variations comparées du pouvoir rotatoire spécifique et de l'hélicité α de solutions de sérum albumine en milieu salin et de ceux du complexe sérum albumine + acide ascorbique formé en milieu non salin et demeuré stable en un milieu salin à diverses concentrations et pH.

Les résultats groupés figures 16 et 17 montrent que l'on ne rencontre ici que de très faibles variations par rapport à celles déjà étudiées figure 10 et que ces variations obéissent aux règles générales qui viennent d'être rappelées.

X- Action du phosphate sodique.

Jusqu'à présent NaCl était seul responsable de la salinité du milieu où se forme le complexe sérum albumine + acide ascorbique, et sa présence diminuait l'importance de la fixation du ligand. Il est donc intéressant de vérifier si d'autres sels et en particulier les phosphates sodiques dont l'addition à des produits alimentaires est toujours possible, possèdent un pouvoir inhibiteur du même ordre.

10-1- Conditions expérimentales.

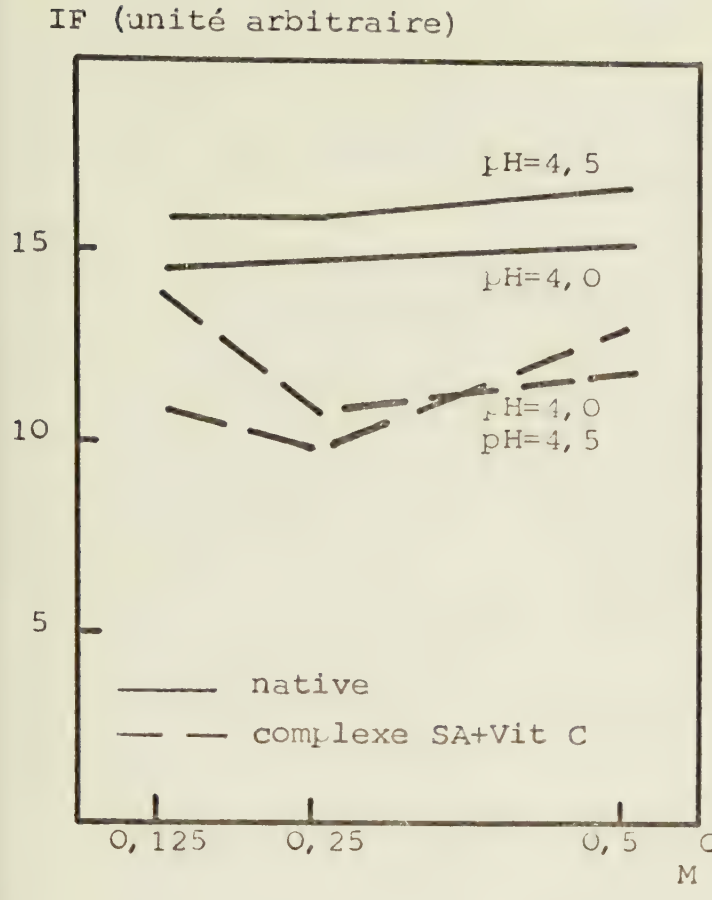
Elles sont identiques à celles mises en oeuvre avec NaCl, à cette différence près que l'on a utilisé ici des solutions 0,05 - 0,1 - 0,25 - et 0,5 N de phosphate sodique dont on ajuste le pH à l'aide d'une solution diluée de H_3PO_4 dans la zone acide.

10-2- Résultats.

La substitution de l'ion PO_4^{---} à Cl^- entraîne un changement total dans le comportement du ligand. Au lieu de limiter l'importance de sa fixation, la salinité ambiante l'augmente notablement. (tableau XVIII). La nature de l'anion est seule responsable de cette augmentation puisque Na^+ salifie les deux acides considérés jusqu'à présent. On constate en outre, que pour un même pH, la fixation croît avec la concentration saline. D'autre part, pour une concentration initiale donnée, la fixation diminue quand le pH augmente (fig. 18), mais elle manifeste une certaine tendance au ralentissement au voisinage du point isoélectrique.

10-3- Etude spectropolarimétrique en présence de PO_4^{---}.

Puisque, à l'inverse de ce que l'on observe en présence de Cl^-, la fixation du ligand s'accroît



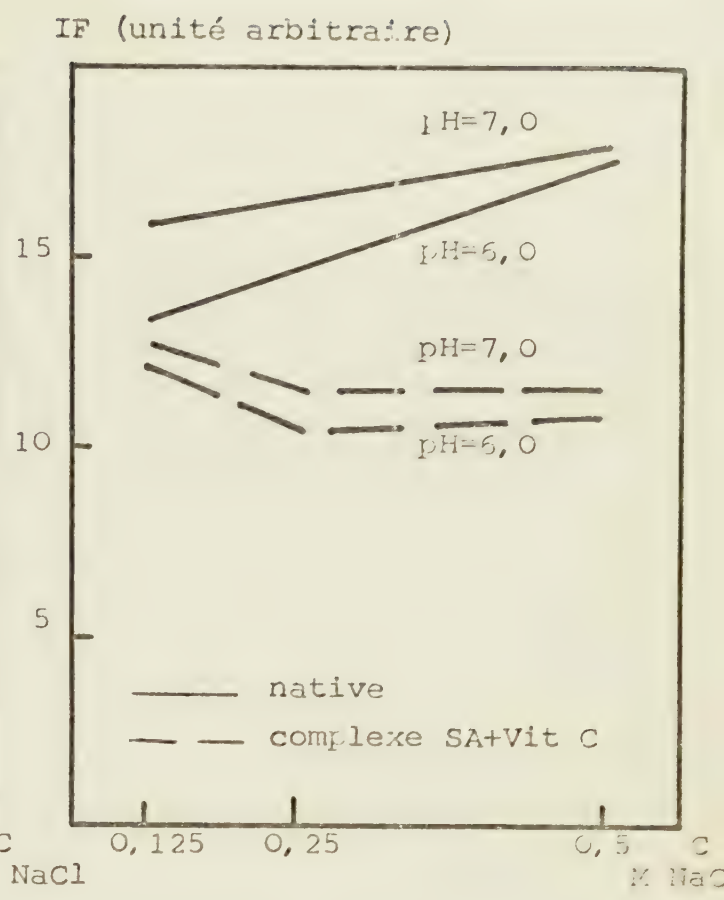
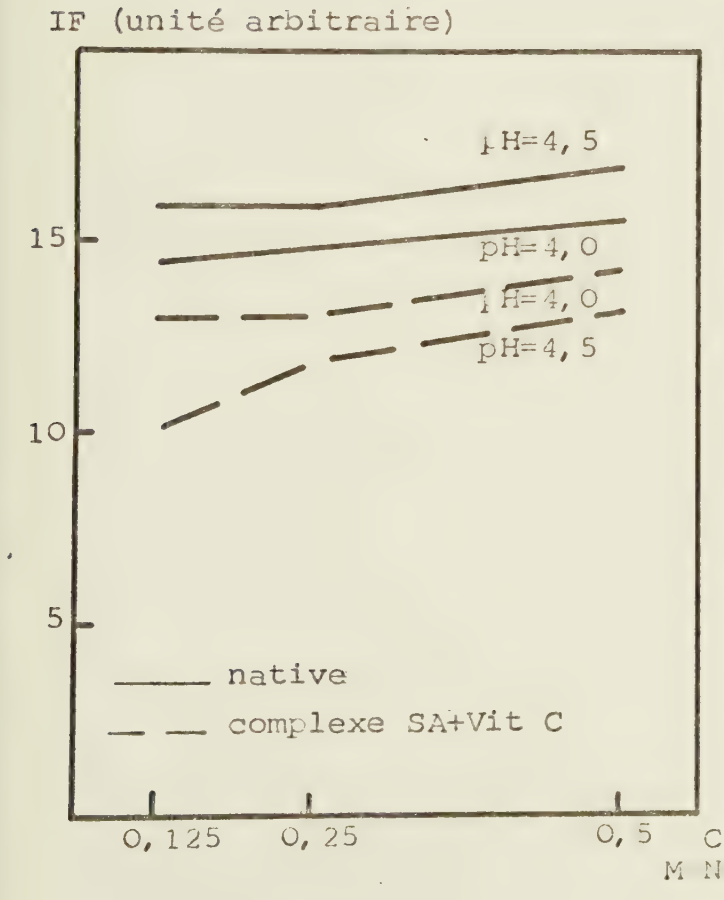


Figure 16 Légende p. 71.



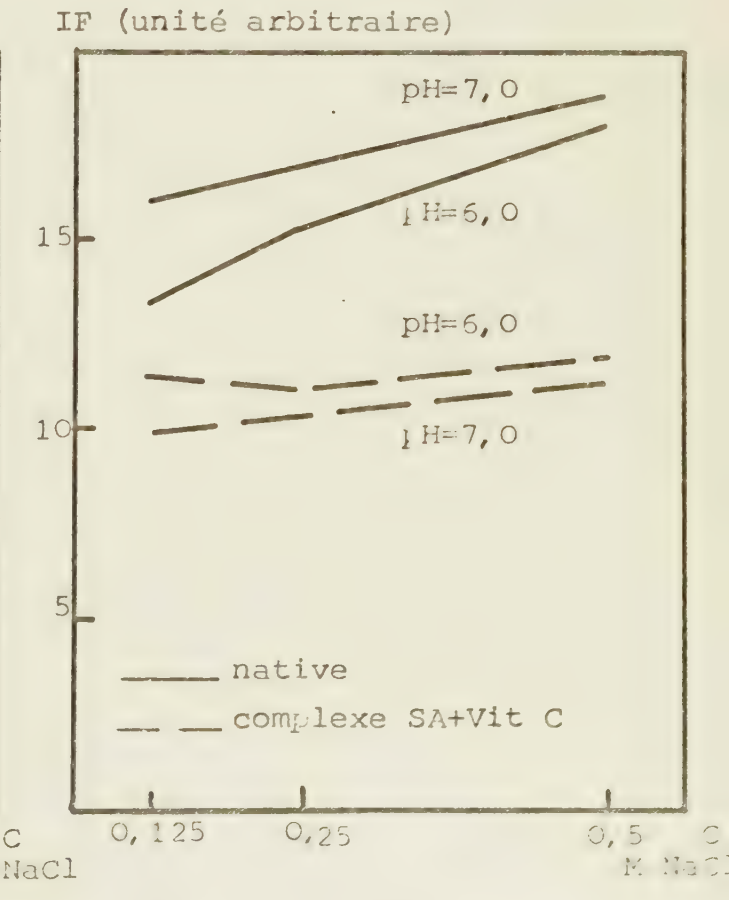


Figure 17- Légende p. 71.

Légende figures 16 - 17-

Variations comparées de l'intensité de fluorescence (unités arbitraires) de la solution de sérum albumine en milieu salin et de celle du complexe sérum albumine, acide ascorbique formé en milieu non salin à diverses concentrations et pH. Concentration initiale en acide ascorbique $1,25 \times 10^{-3}$ M.
Température +20°C.

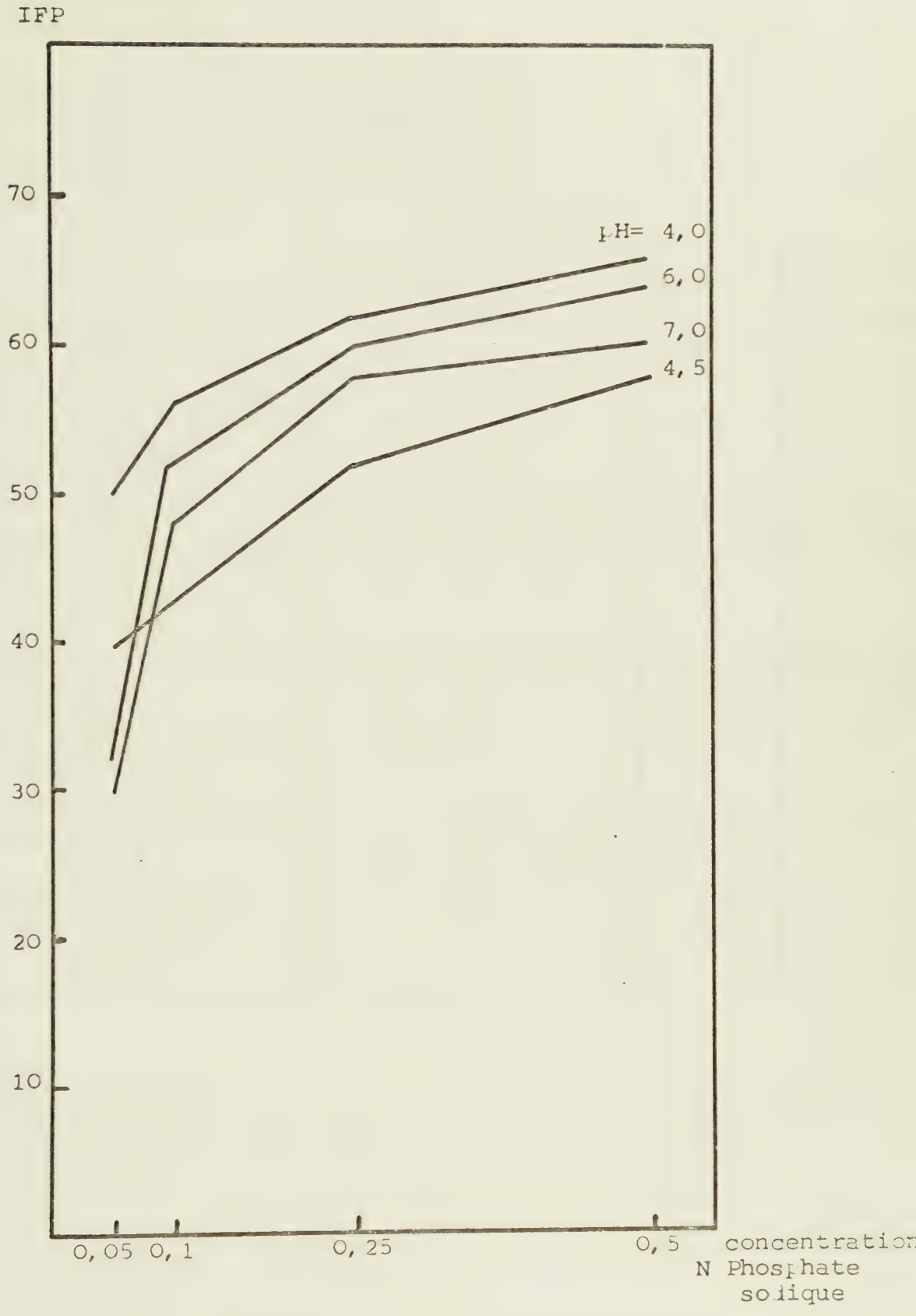


Figure 18- Variation de l'IFP de l'acide ascorbique sur la serum albumine en fonction de la concentration en phosphate sodique et du pH. Sérum albumine à 0, 5 g/litre - acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M. Température +20°C.

Tableau XVIII.

pH	Expression de la fixation	Concentrations salines Na_2HPO_4			
		0, 05 N	0, 1 N	0, 25 N	0, 5 N
4, 0	IFP	50	56	62	66
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	190	213	236	251, 4
4, 5	IFP	40	44	52	58
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	152	167, 5	198	220, 7
6, 0	IFP	32	52	60	64
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	121, 8	198	228	244
7, 0	IFP	30	48	58	60
	moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	114	182, 6	220, 7	228

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine en fonction de la concentration en phosphate sodique et du pH. Sérum albumine à 0, 5 g/litre. Acide ascorbique $2, 5 \times 10^{-3}$ M. Température +20°C.

lorsqu'augmente la concentration du milieu en PO_4^{---}, il est intéressant de rechercher si la présence de cet ion entraîne des modifications sensibles de la structure de la sérum albumine et du complexe sérum albumine + acide ascorbique.

Résultats.

Ils montrent -tableau XIX) qu'en présence de PO_4^{---} l'hélicité α de la sérum albumine native ne présente que des variations mineures par rapport à celle observée en l'absence de sel (tableau V) ou en présence de NaCl (tableau IX).

Contrairement à ce que l'on aurait pu supposer au premier abord, on retrouve ici une légère augmentation de l'hélicité α de la protéine native déjà notée en présence du NaCl (tableau IX) et pour le complexe sérum albumine + acide ascorbique, une diminution de l'hélicité α par rapport à celle de la protéine native.

Précisons qu'ici encore cette diminution est d'autant plus marquée que la fixation est elle-même plus importante. Cependant pour une même valeur de pH l'hélicité α du complexe diminue avec la concentration en PO_4^{---}.

10-4- Etude spectrofluorimétrique.

Elle a été réalisée pour des raisons analogues à celles qui ont motivé une étude structurale des complexes sérum albumine + acide ascorbique.

Résultats.

Contrairement à l'augmentation de la fluorescence de la sérum albumine native constatée quelque soit le pH lorsque s'accroissait la chlorinité du milieu où elle était dissoute, c'est globalement une diminition que l'on observe lorsqu'augmente la teneur en PO_4^{---} du milieu. Cette règle doit être légèrement nuancée puisque pour les pH inférieurs ou égaux au point isoélectrique une solution phosphatée 0,1 N entraîne une légère augmentation de la fluorescence.

Tableau XIX- a -

pH	concentrations salines exprimées en PO_4^{---}	Sérum albumine native		Sérum albumine + vitamine C	
		$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %
4, 0	0, 05 N	-7024	41	-6146, 2	34
	0, 1 N	-6673	38, 2	-6321	35, 5
	0, 25 N	-7024	41	-5443, 7	29
	0, 5 N	-7199, 8	42, 5	-5268	28, 2
4, 5	0, 05 N	-7199	42, 5	-6321	35, 6
	0, 1 N	-7260	43	-6146	34
	0, 25 N	-7024	41	-5092, 5	26
	0, 5 N	-7375	43, 9	-5970, 6	32

Variations du pouvoir rotatoire spécifique à 233 nm et de l'hélicité α en fonction de la concentration en phosphate sodique et du pH. Sérum albumine 0, 5 g/l. Acide ascorbique 2, 5 x 10^{-3} M. Température + 20° C.

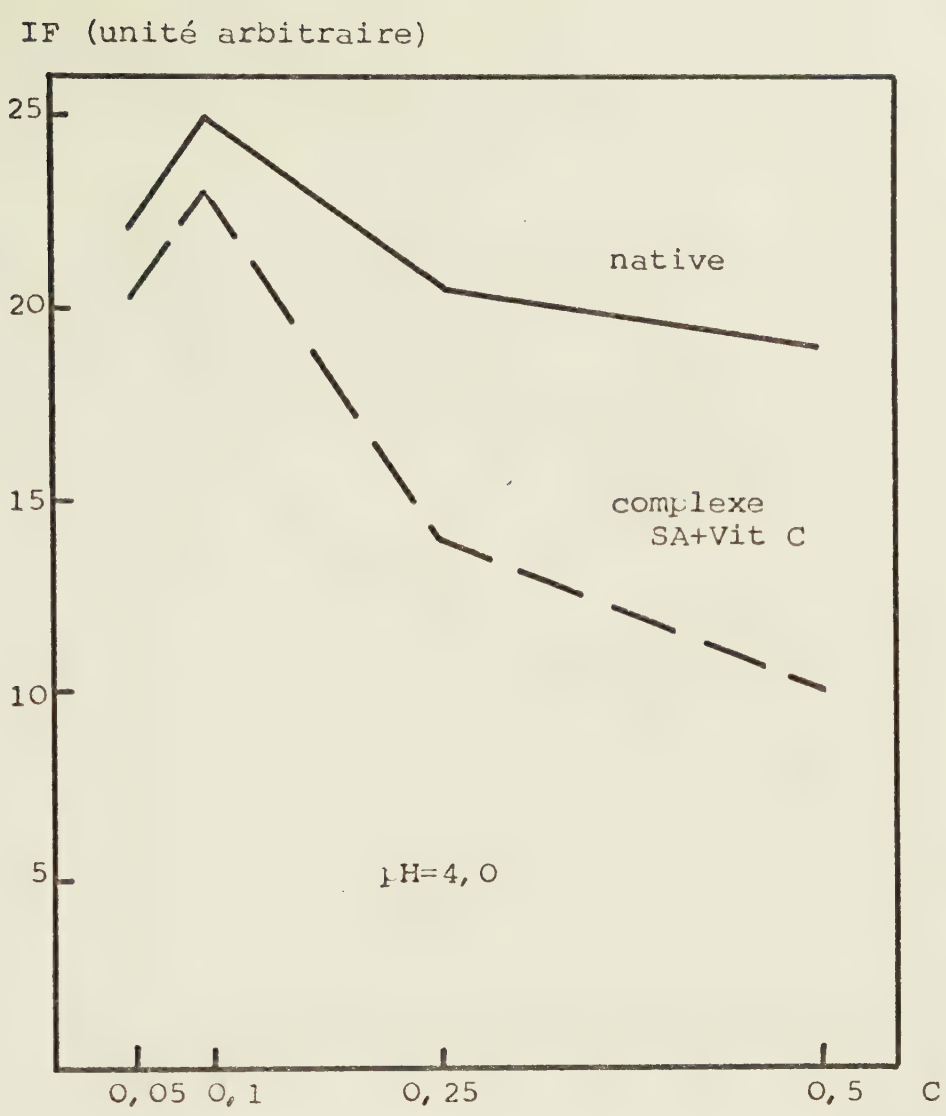
Tableau XIX-b-

pH	concentrations salines exprimées en PO_4^{---}	Sérum albumine native		Sérum albumine + vitamine C	
		$[\alpha]_{233}$	hélicité α %	$[\alpha]_{233}$	hélicité α %
6,0	0,05 N	-7551	45,2	-7199,8	42,5
	0,1 N	-7199,8	42,5	-6848,6	39,7
	0,25 N	-7375	44	-6321,7	35,6
	0,5 N	-7551	45,2	-5970	32,8
7,0	0,05 N	-7199,8	42,5	-6948	40
	0,1 N	-6848	39,7	-6673	40
	0,25 N	-7260	43	-6848	39,7
	0,5 N	-7375	44	-5970,2	32,8

Variations des pouvoirs rotatoires spécifiques et de l'hélicité α en fonction de la concentration en phosphate sodique et du pH. Sérum albumine à 0,5 g/litre. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M. Température + 20°C.

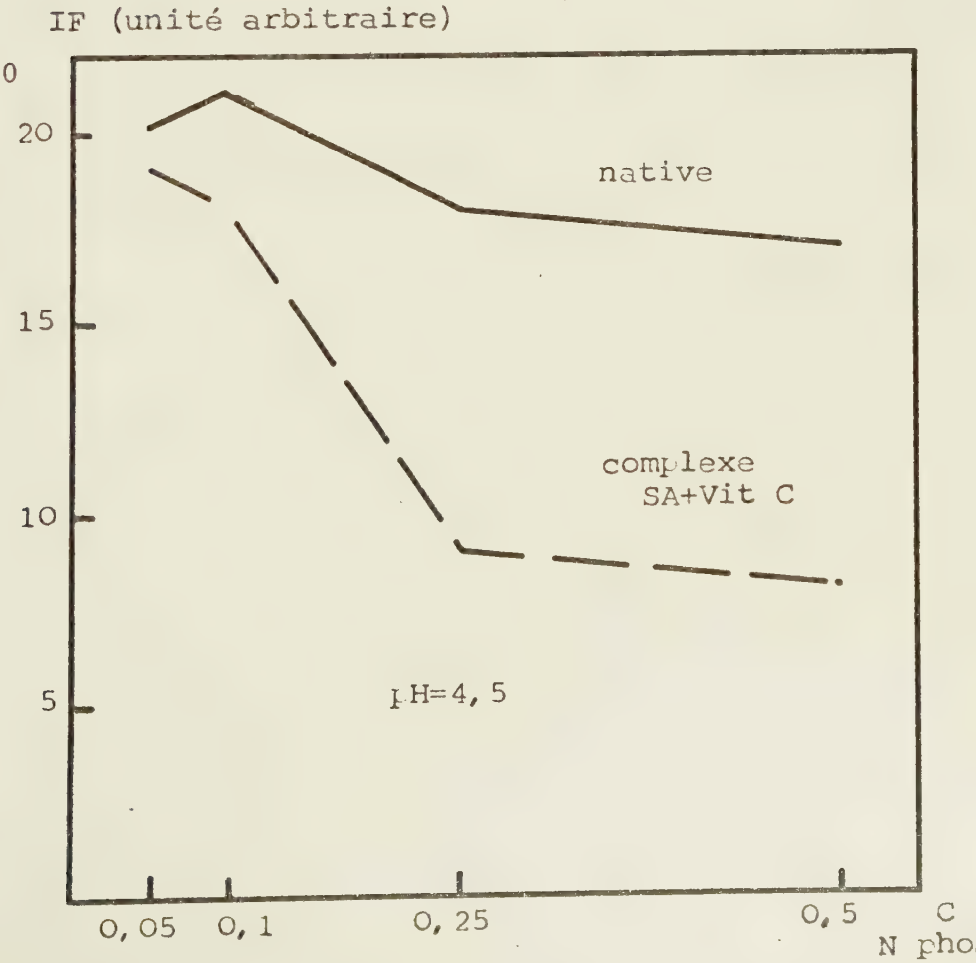
De plus, en fonction du pH et de la concentration en PO_4^{---}, λ maximum du spectre de fluorescence subit des déplacements entre 325 et 340 nm (au lieu de 333 à 340 en présence de Cl^-).

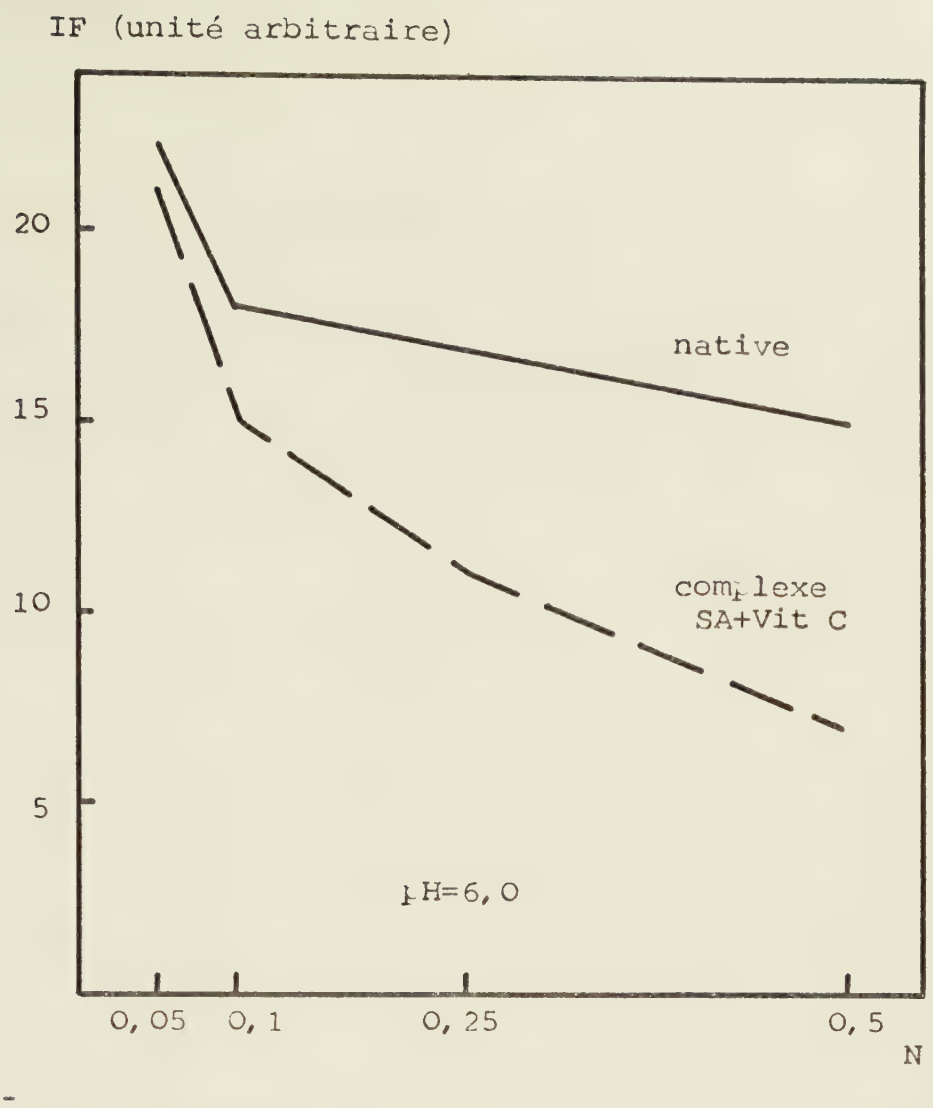
En ce qui concerne la fluorescence du complexe sérum albumine + acide ascorbique, son intensité décroît par rapport à celle de la seule sérum albumine, pour toutes les valeurs de pH et concentrations salines étudiées. Cette diminution est directement liée à l'importance de la fixation puisque celle-ci s'accroît avec la concentration en PO_4^{---}. (Fig. 19).



igure 19-a-

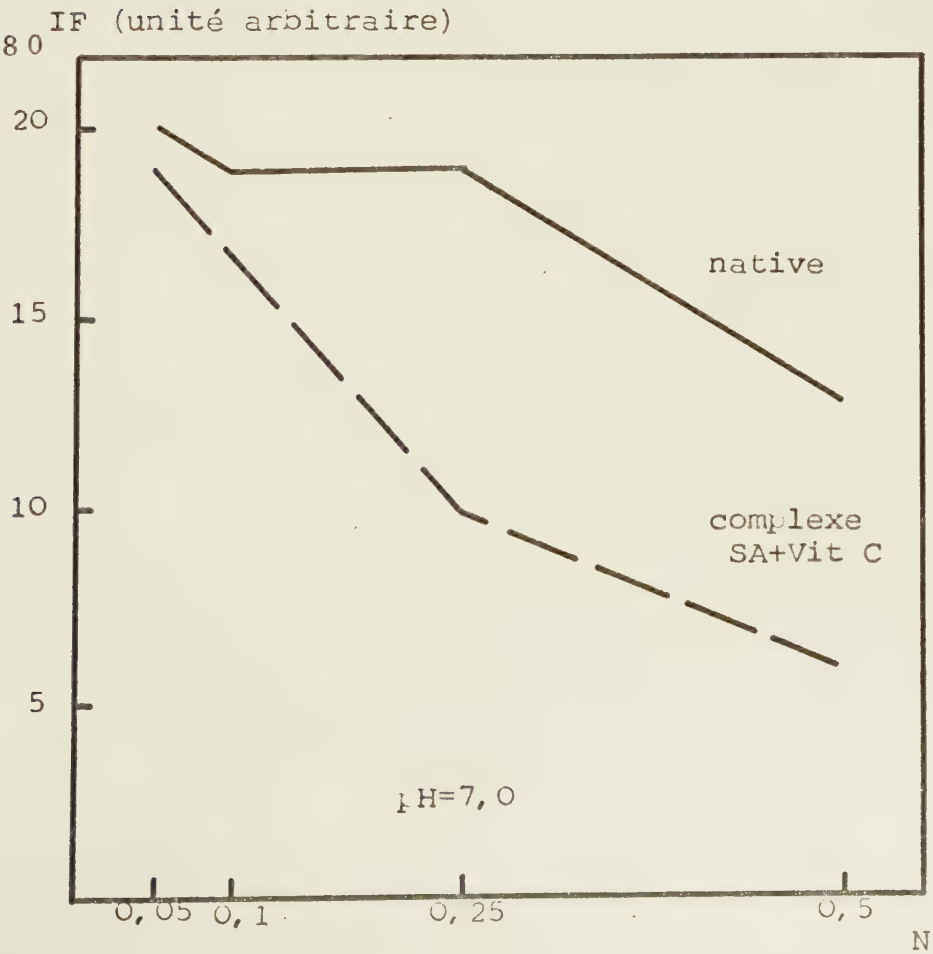
égende p. 80





igure 19-b-

égende p. 80



Légende figures 19-a- 19-b-

Variations comparées de l'intensité de fluorescence de la sérum albumine avant et après la fixation de l'acide ascorbique en fonction de la concentration en phosphate sodique et du pH. Sérum albumine à 0,5g/l. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M. Température +20°C.

RESUME ET CONCLUSIONS.

Les deux premiers chapitres qui correspondent en fait à une première partie relativement théorique du présent travail, rendent compte d'une expérimentation poursuivie sur la sérum albumine bovine choisie comme "modèle" protéique.

- Cette expérimentation a permis de préciser les conditions dans lesquelles l'acide ascorbique est susceptible de se fixer sur une protéine sanguine.

- Il a été montré que si le taux de la protéine présente demeure constant, l'amplitude de la fixation dépend de quatre facteurs qui ont été particulièrement étudiés :

-1- pH du milieu.

-2- Concentration initiale de la solution d'acide ascorbique placée au contact de la protéine.

-3- Température.

-4- Concentration saline.

——— 1 - pH du milieu.

L'amplitude de la fixation augmente lorsque le pH croît à partir du point isoélectrique.

——— 2 - La fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine augmente toujours lorsque croît la concentration vitaminique du milieu.

——— 3 - Lorsque la température croît de + 4°C à +20°C, la quantité de la vitamine fixée augmente de façon limitée.

——— 4 - Si l'on augmente la concentration en NaCl du milieu, le taux de fixation de l'acide ascorbique diminue rapidement.

- Lorsque la protéine est préalablement placée en milieu salin de concentration double de celle avec laquelle le complexe vitaminique formé se trouvera finalement en équilibre, le taux de fixation est beaucoup plus faible que lorsque l'on mélange des solutions isohyalines de

protéine et d'acide ascorbique, bien que la salinité définitive du mélange soit équivalente à la précédente.

- Si l'on fixe la vitamine sur la protéine dans un milieu dessalé et que l'on ajoute ensuite le sel dans ce milieu, la quantité de vitamine demeurant fixée est beaucoup plus importante que si la fixation s'était directement opérée en présence de la même concentration saline.

- Si la fixation de la vitamine C sur la sérum albumine s'effectue non plus en présence de NaCl mais dans un milieu phosphaté sodique, le taux de fixation augmente avec la concentration en PO_4^{---}.

CHAPITRE III-

Introduction.

Le fait d'avoir utilisé la sérum albumine bovine comme un "modèle" de protéine capable de fixer l'acide ascorbique a permis, en principe, de connaître certains aspects pratiques des règles générales auxquelles devrait obéir le ligand ascorbique lorsqu'il se fixe sur une molécule protéique.

Chaque protéine cependant demeure éventuellement susceptible de se comporter de façon particulière surtout en ce qui concerne l'importance de la fixation. Il est donc apparu nécessaire de reproduire comparativement sur une nouvelle molécule protéique l'expérimentation préalablement réalisée sur la sérum albumine. Afin d'étendre les connaissances relatives au mécanisme de la fixation en fonction de l'environnement ionique de la protéine et du ligand, les modalités de fixation seront étudiées en présence de nombreux sels.

La nouvelle protéine de référence choisie est la β-lactoglobuline bovine, et deux raisons principales ont guidé ce choix.

Tout d'abord elle est le composant majeur des protéines du lactosérum, sous-produit de l'industrie fromagère. Il serait par conséquent envisageable de pouvoir disposer d'un important tonnage de ces protéines que l'utilisation de membranes filtrantes permet actuellement de récupérer de façon peu onéreuse.

La seconde raison est que la β-lactoglobuline comme probablement toutes les protéines globulaires doit être capable de fixer un certain nombre de substances diverses dont la nature peut aller de l'ion le plus

simple à la macromolécule la plus complexe (PANTALONI (47)).

Contrairement aux globulines plasmatiques la β -lactoglobuline est relativement soluble dans l'eau distillée, mais sa solubilité diminue au voisinage du point isoélectrique (pH 5,3). Elle possède aussi la particularité d'être soluble, tout comme la α -lactabulmine, dans les solutions de $MgSO_4$ à saturation.

La biosynthèse de la β -lactoglobuline est génétiquement contrôlée au niveau de la glande mammaire. Chez les bovins ASCHAFFENBURG et DREWY (48) en avaient primitivement décrit deux formes qu'ils appelèrent A et B. Ultérieurement deux nouveaux variants C et D furent mis en évidence par BELL et Mc KENZIE (49) puis par GROSCLAUDE (50) respectivement.

Ces formes qui ne diffèrent entre elles que par quelques points de détails concernant la séquence des acides aminés, ont des propriétés physico-chimiques très voisines et syncristallisent. Elles coexistent dans les laits de grand mélange qui parviennent aux usines où il est hors de question de les séparer.

L'actuelle expérimentation a donc été réalisée sur de la β -lactoglobuline préparée et purifiée à partir d'échantillons commerciaux de lait, sans tenir compte de l'éventuelle diversité des formes A, B, C ou D présentes.

Un essai pratique de fixation d'un composé vitaminique, la Flavine mono nucléotide, a déjà été réalisé avec succès par VALENTIN (51) mais rien n'indique à priori que l'acide ascorbique se comportera de façon similaire. La fixation d'un ligand sur un ou plusieurs sites d'une chaîne protéique dépend en effet de facteurs multiples parmi lesquels les fonctions chimiques présentes se trouvent au premier rang.

II- Préparation de la β -lactoglobuline.

Elle est réalisée selon la technique de ASCHAFFENBURG et DREWY (52).

Rappelons brièvement qu'elle consiste en un premier temps à éliminer la caséine ainsi que la frac-

tion dîte lactoglobuline et la totalité des matières grasses, par précipitation en présence de $Na_2 SO_4$.

Dans le filtrat se trouve la fraction lactal-bumine brute c'est-à-dire un mélange de α - lactalbumine, sérum albumine et β-lactoglobuline. Bien qu'appartenant au groupe des globulines, cette dernière protéine est soluble en présence de Na_2SO_4 et s'extrait donc avec les albumines.

Ces dernières précipitent lorsque le milieu sulfaté est porté à pH 2,0, tandis que la β-lactoglobuline demeure en solution.

Celle-ci est portée à pH 6,0 et l'addition de sulfate d'ammonium provoque la floculation de la β-lactoglobuline. Le précipité est dissous dans l'eau distillée après ajustement à pH 5,25 (point isoélectrique), et la solution dialysée contre de l'eau distillée pour éliminer les ions résiduels. La protéine cristallise quand l'élimination est totale.

Les cristaux obtenus sont séchés sous vide à basse température. L'expérience a montré que des recristallisations n'amélioraient pratiquement pas leurs critères de pureté.

III- Détermination de la masse moléculaire apparente de la β-lactoglobuline bovine.

3-1- Généralités.

Alors que la masse moléculaire de la sérum albumine ne varie pratiquement pas avec le pH, il n'en est pas de même de celle de la β -lactoglobuline. Il a donc fallu d'abord contrôler si, en fonction du pH, les variations de la masse moléculaire de cette dernière protéine préparée au laboratoire étaient identiques à celles déjà publiées. Une telle vérification de la pureté de la β -lactoglobuline utilisée s'avérait nécessaire puisque l'un des modes d'expression de la fixation de l'acide ascorbique consiste à noter le nombre de molécules de ce ligand fixées sur une molécule de cette protéine.

3-2- Principes et techniques.

La masse moléculaire apparente est une des principales caractéristiques physiques des molécules protéiques. Des techniques très variées permettent cette détermination et en particulier la photo-gonio-diffusométrie. Celle-ci est basée sur le fait que si l'on éclaire un milieu contenant des macromolécules dissoutes, une partie de la lumière incidente sera diffusée (effet Rayleigh).

Dans le cas précis du photo-gonio-diffusomètre de WIPLER et SHEIBLING,* que nous avons utilisé ici, l'intensité de la lumière diffusée est reliée à la masse moléculaire apparente par la relation :

$$\frac{1}{Mw} = 0,506 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \frac{c}{Im} \times 10^2$$

c = concentration en g/l de la solution
Im = moyenne de l'intensité lumineuse diffusée par le soluté aux différents angles (de 30° à 145° dans le cas de l'appareil utilisé).
$\frac{dn}{dc}$ = incrément spécifique d'indice.

Les différentes valeurs de $\frac{dn}{dc}$ sont déterminées par réfractométrie à l'aide de l'interféromètre différentiel de HILGER et WATTS.

Avant chaque mesure les solutions sont dépoussiérées par centrifugation à 17000 tours/mn pendant 30 mn. Les mesures sont réalisées à la température ambiante.

3-3- Résultats.

La concentration des solutions utilisées est de 0,5 g/litre. La valeur de Mw à chaque pH résulte de la moyenne des résultats obtenus à partir des mesures effectuées au moins trois fois.

Ces résultats correspondent à ceux obtenus par TIMASCHEFF et TOWNEND (53), PREAUX et LONTIE (54) et AZANZA (55).

pH	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0
Mw	19000 ± 2000	38000 ± 2000	36000 ± 2000	41000 ± 2000	22000 ± 2000

* Construit par FICA - Le Mesnil St Denis 78.

Pour expliquer l'évolution de la masse moléculaire apparente de la β-lactoglobuline en fonction du pH, on admet qu'au point isoélectrique et dans une certaine étendue de pH, de part et d'autre de ce point, la Mw correspond à la formation d'un dimère constitué de deux chaînes polypeptidiques identiques, suivant le modèle proposé par GREEN et ASCHAFFENBURG (56). TANFORD (57) devait préciser que l'union des deux sous-unités était sous la dépendance de forces hydrophobes.

La dissociation progressive des deux chaînes polypeptidiques apparaît pour des pH inférieurs à 4,0 (TIMASCHEFF et TOWNEND (53), ou supérieurs à 6,0 (GEORGES et GUINARD (58)).

Etant donné que l'évolution de la structure quaternaire est fonction du pH, il semble évident que les forces responsables de ce phénomène soient de nature électrostatique. C'est ainsi que pour des pH acides et en particulier pour ceux inférieurs à 4,0, la dissociation serait due à l'apparition des charges positives sur chacun des monomères. De même, au dessus de pH = 6,0, l'apparition de charges négatives créent des forces de répulsion susceptibles d'entraîner la dissociation du dimère.

IV- Fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline.

4-1- Techniques.

1°- Matériel utilisé.

a- -lactoglobuline bovine.

La protéine utilisée est la β-lactoglobuline cristallisée, obtenue à partir du lait de vache comme il vient d'être précisé.

b- L'acide ascorbique a été aimablememt fourni par la société HOFFMANN- La ROCHE.

2°- Conditions expérimentales.

- Solutions utilisées.

L'expérimentation est conduite sur des solutions de β-lactoglobuline à 1 g/l dans l'eau distillée. L'utilisation d'une faible agitation magnétique permet

l'obtention de solutions parfaitement limpides.

-L'acide ascorbique dissous dans l'eau distillée est utilisé à diverses concentrations en fonction de la nature des expérimentations à réaliser.

- pH expérimental.

L'étude de la fixation en fonction du pH a été réalisée pour les pH suivants : 4,0 - 5,0 - 6,0 et 7,0. Dans cette gamme du pH la vitamine C est relativement stable.

Le pH des solutions vitaminiques et protéiques est ajusté sans l'aide d'un tampon comme dans le cas de l'expérimentation sur la sérum albumine.

- Conditions de température.

La fixation a été étudiée successivement à +4° et +20°C car à partir de 25°C la vitamine C en solution cesse d'être stable.

- Concentration saline.

La présence de divers anions et cations dans le milieu expérimental pouvant modifier de façon très importante la fixation de l'acide ascorbique, l'étude a d'abord été conduite, comme dans le cas de la sérum albumine, sur des solutions dépourvues de salinité. Nous avons ensuite cherché à connaitre les modalités de fixation en présence de différents anions et cations.

- Technique de fixation.

La technique est la même que celle utilisée dans la première partie de ce travail.

3°- Méthode de dosage de l'acide ascorbique.

On adopte la méthode spectrophotométrique déjà utilisée dans la première partie.

V- 1° - Variation de la fixation en fonction du pH.

La β-lactoglobuline est peu soluble à

son point isoélectrique (pHi = 5,3). L'étude de la variation de la fixation a été réalisée au voisinage du point isoélectrique (pH = 5,0) et de part et d'autre de cette valeur (pH = 4,0 - 6,0 - 7,0).

- Tout au long de l'expérimentation, la concentration du milieu en β- lactoglobuline demeure uniformément 0,5 g/litre.

- La concentration du milieu en acide ascorbique reste elle aussi constante ($2,5 \times 10^{-3}$ M).

- La température est +4°C.

5-1- Les résultats sont présentés dans le tableau XX et Fig. 20.

Tableau XX-

Expression de la fixation	pH			
	4,0	5,0	6,0	7,0
IFP	19	14,5	22	20
moles d'ac. ascorbique/mole de sérum albumine	41	29,5	51,2	25

Variations en fonction du pH, de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline bovine.

De l'étude de ce tableau il ressort que dans les limites étudiées :

- Quelle que soit la valeur du pH, l'acide ascorbique se fixe sur la β-lactoglobuline.

- L'IFP est minimum au voisinage du point isoélectrique et croît lorsque le pH diminue ou augmente par rapport au pHi.

- L'IFP est maximum à pH = 6,0. C'est aussi le pH où la stabilité de la vitamine C est maximale.

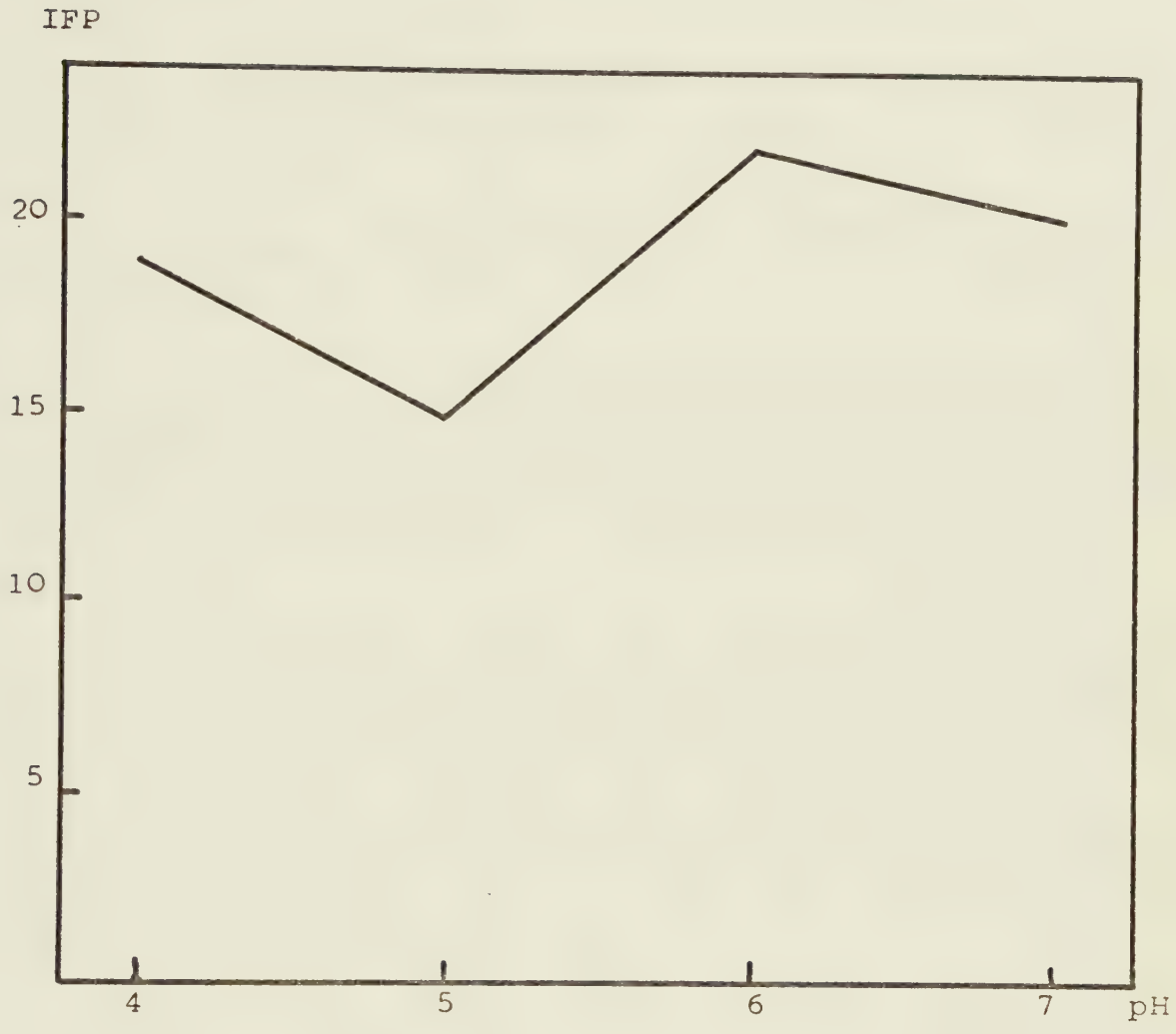


Figure 20- Variation de l'IFP en fonction du pH. β-lactoglobuline à 0,5 g/l. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M. Température 4°C.

——— 5-2- Etude spectropolarimétrique.

Elle a été réalisée comme dans le cas de la sérum albumine. Rappelons cependant que le spectre DOR de la β-lactoglobuline présente entre 200 et 300 nm, un effet Cotton caractérisé par :

- Un extrêmum positif à 205 ± 2 nm
- Un extrêmum négatif qui présente deux puits à λ = 233 ± et 231 ± 1 nm.

Dans cette zone le spectre DOR de l'acide ascorbique ne présente, avons-nous vu, aucune particularité.

Le but de cette étude est de rechercher si la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline s'accompagne de modifications de l'hélicité comparables à celles observées dans le cas de la fixation sur la sérum albumine. Les résultats indiqués dans le tableau XXI sont relatifs au puits axé sur 235 nm.

Leur valeur est telle qu'il n'est plus possible d'utiliser la relation de JIRGENSONS (27) pour évaluer ici le pourcentage d'hélicité α. La présence d'un puits de faible amplitude à 235 nm (Fig. 21), montre cependant l'existence de cette structure et son faible pourcentage. L'amplitude de l'extrêmum négatif du spectre d'effet Cotton du complexe β-lactoglobuline - acide ascorbique diminue à pH = 4,0 et augmente pour les autres pH étudiés, par rapport à ce que l'on observe pour la protéine native.

Le comportement de la β-lactoglobuline diffère donc légèrement de celui de la sérum albumine au voisinage du point isoélectrique.

Comme dans le cas de cette dernière il semble que l'on puisse éventuellement considérer un accroissement de l'amplitude de l'extrêmum négatif, non pas comme une augmentation de l'hélicité α de la β-lactoglobuline, mais comme le reflet d'une organisation structurée du ligand et peut-être des molécules d'eau entourant la protéine. Cette organisation se modifie en fonction du pH.

Tableau XXI-

β-lactoglobuline	(M') 235 pH			
	4,0	5,0	6,0	7,0
native	1492 ± 100	1053 ± 100	1756 ± 100	1682 ± 100
complexe acide ascorbique + β-lactoglobuline	878 ± 100	2107 ± 100	2985 ± 100	3248 ± 100

Variation de l'amplitude de l'extrêmum négatif de λ_{235} de l'effet Cotton d'un complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique obtenu à différentes valeurs du pH.

5-3- Etude spectrofluorimétrique.

Etant donné que la fixation de l'acide ascorbique diminue l'intensité de fluorescence de la sérum albumine, ce qui laisse supposer que cette fixation s'effectue soit au niveau de restes tryptophane, soit en leur voisinage immédiat, il est intéressant de rechercher si le même phénomène se produit pour la β-lactoglobuline.

La longueur d'onde excitatrice choisie est $\lambda = 278 \pm 2$ nm ; elle correspond à l'absorption maximum de la β-lactoglobuline. L'enregistrement du spectre d'analyse a été effectué entre 300 et 400 nm et présente un maximum à 340 nm. La concentration en β-lactoglobuline est de 5×10^{-2} g/litre.

Résultats.

En milieu acide, on constate une augmentation de la fluorescence de la protéine native ce qui semblerait traduire un "démasquage" de certains restes tryptophane et tyrosine (55). Figure : 22.

Rappelons qu'au point isoélectrique, la

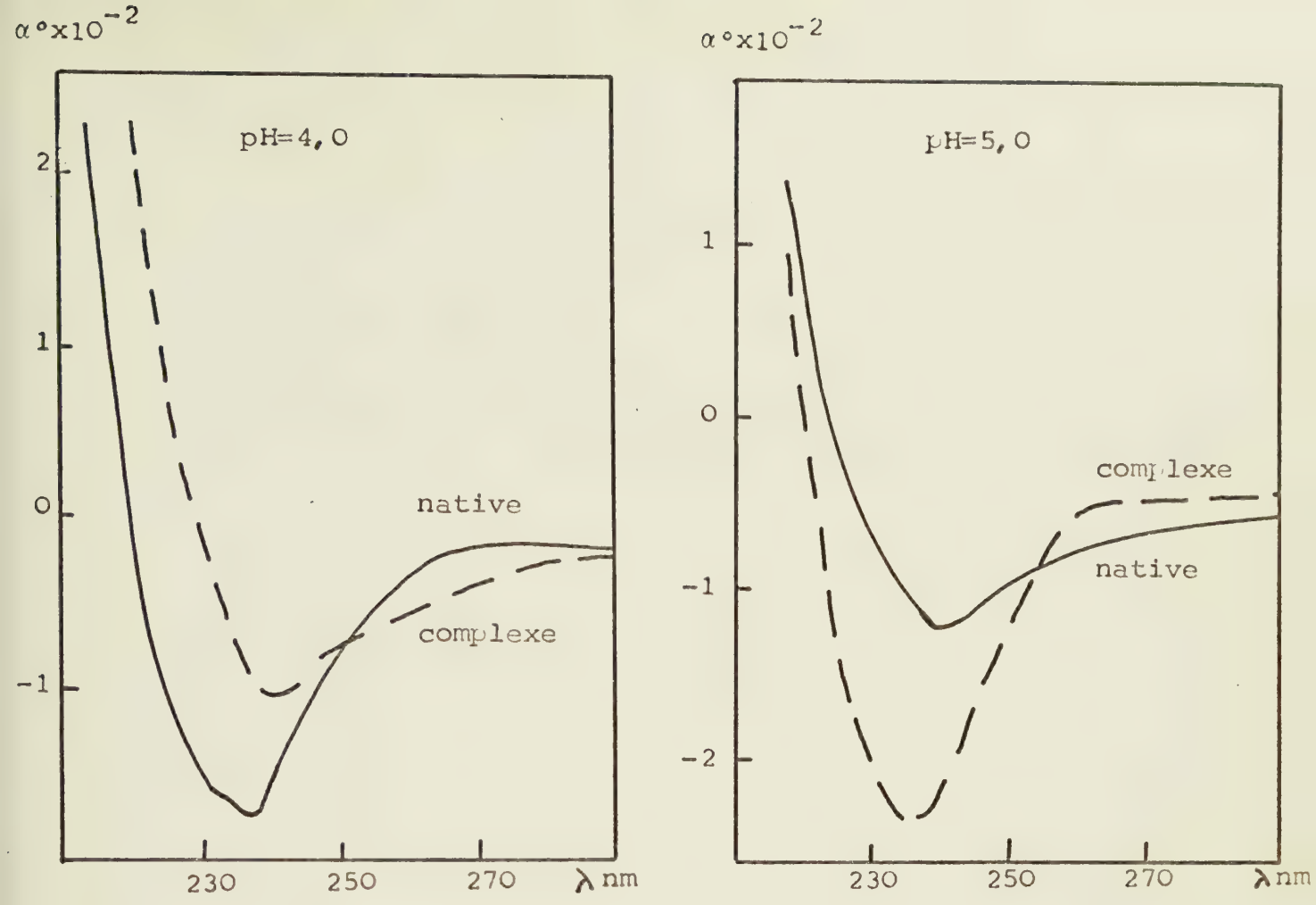
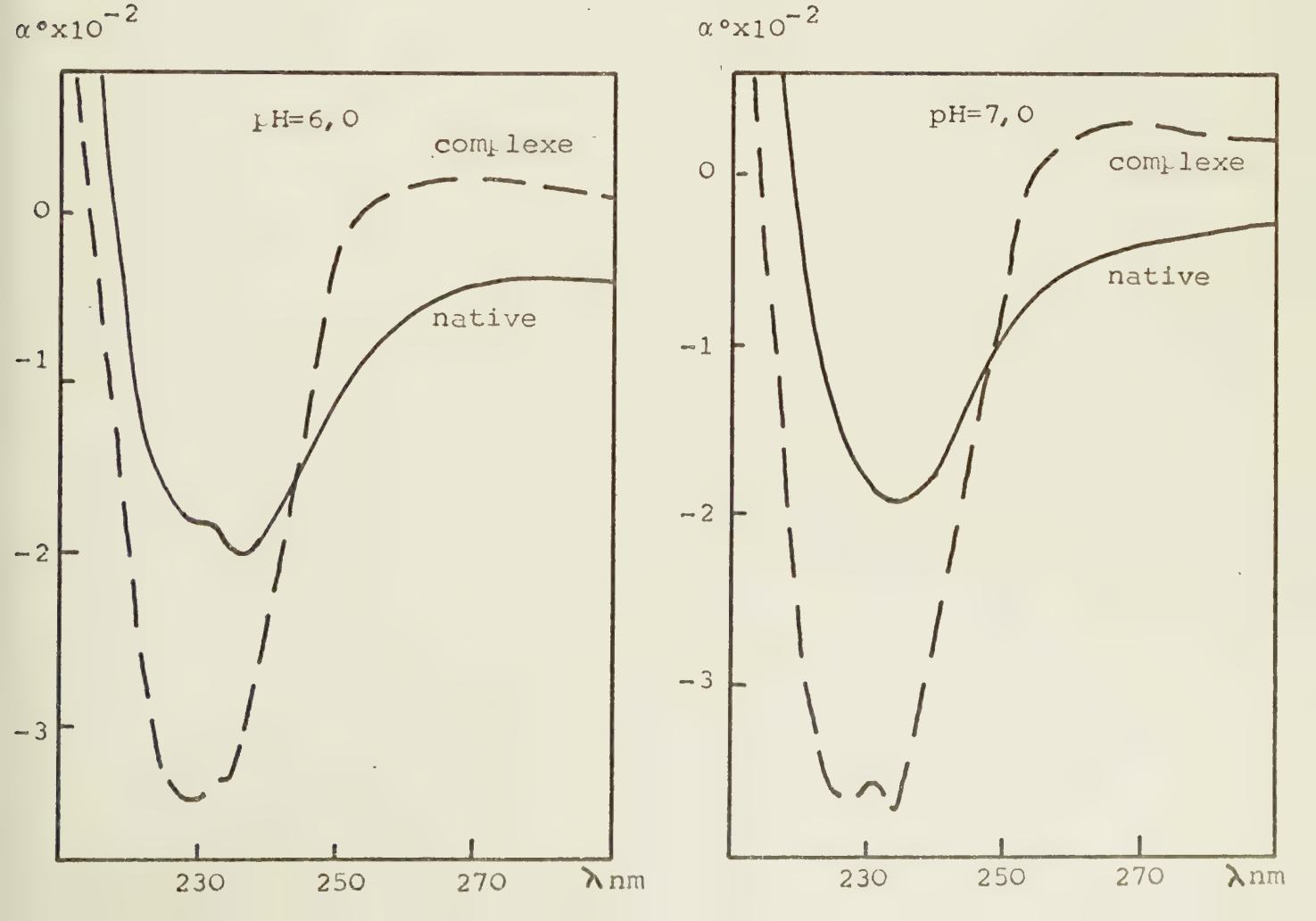


Figure 21- Légende p. 94.



Légende figure 21-

Comparaison des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline native et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique obtenus à différents pH.

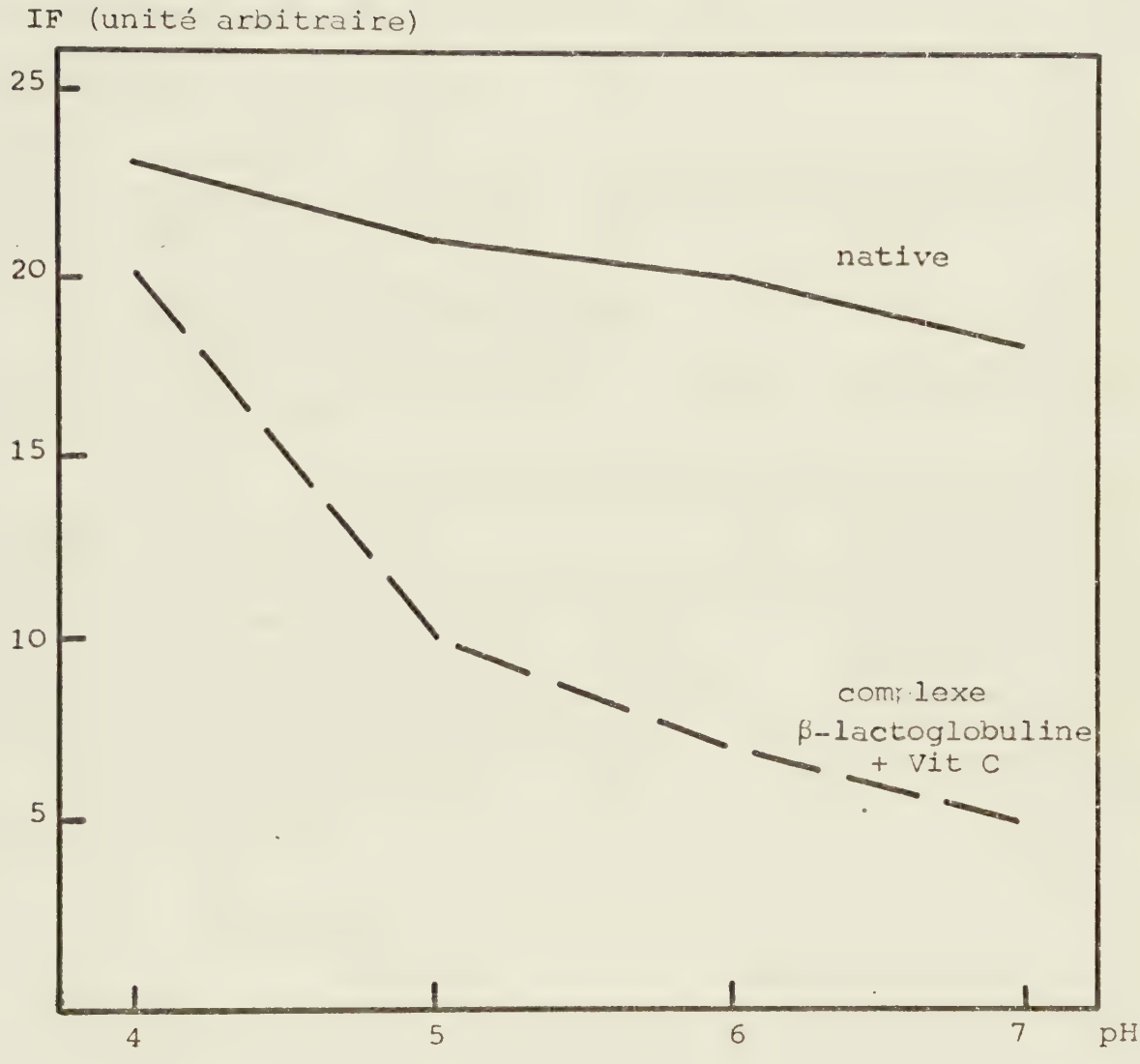


Fig. 22- Variations comparées en fonction du pH du maximum de l'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après la fixation d'acide ascorbique (unités arbitraires). β-lactoglobuline à 0,5 g/l. acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M. Température 4°C.

configuration de la β-lactoglobuline bovine est celle d'un dimère. Si l'on acidifie ou alcalinise le milieu ambiant, le dimère tend progressivement à se dissocier en monomères.

- L'intensité de la fluorescence diminue en fonction du pH aussi bien dans le cas de la β-lactoglobuline native que dans celui du complexe ascorbique. L'amplitude de cette diminution est en rapport directe avec l'importance de la fixation.

- Le maximum d'intensité de fluorescence de 340 nm pour la β-lactoglobuline native à 345 nm pour le complexe ascorbique.

VI- Action de la température.

6-1- Variation de la fixation en fonction de la température.

La concentration en acide ascorbique demeurant constante ($2,5 \times 10^{-3}$ M), au contact de la β-lactoglobuline, on a recherché si, comme dans le cas de la sérum albumine, une élévation de la température augmentait l'importance de la fixation et si les éventuelles augmentations étaient de valeurs comparables. L'instabilité de la vitamine C à des températures supérieures à l'ambiance, limite considérablement la marge des températures expérimentales et l'on a seulement opéré comparativement à +4 et +20°C; (tableau XXII et fig. 23).

Résultats.

Comme on l'avait constaté pour la sérum albumine l'IFP croît légèrement avec la température de fixation pour toutes les valeurs de pH étudiées.

6-2- Etude spectropolarimétrique.

De l'étude du tableau XXIII il ressort qu'à l'image de ce que l'on a observé pour la sérum albumine, l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton de la β-lactoglobuline native diminue lorsque la température croît de +4 à +20°C. Il en est de même ici pour le complexe ascorbique sauf dans la zone d'acidité par rapport au point isoélectrique. Rappelons

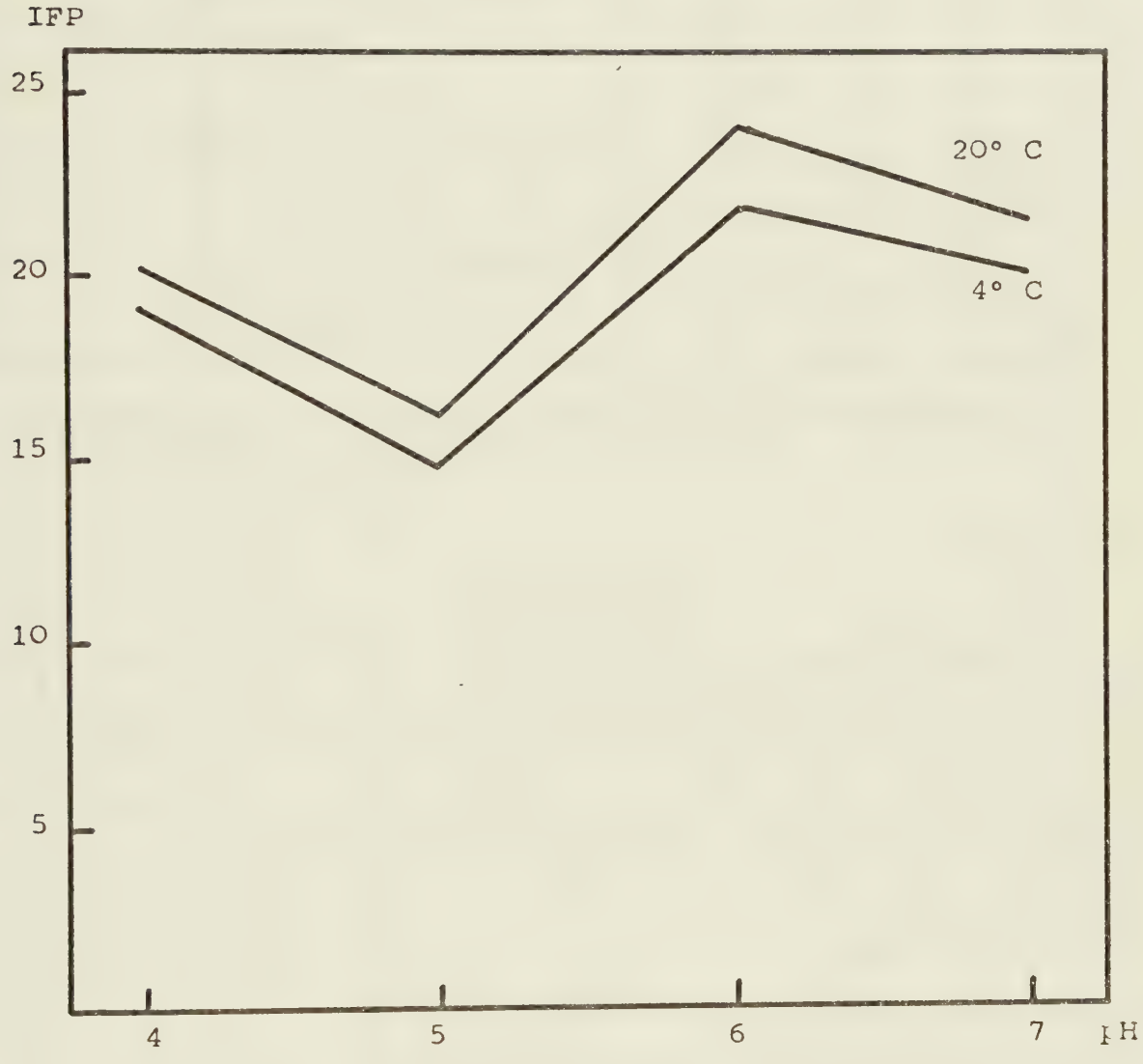


Figure 23- Variation de l'IFP en fonction de la température et du pH. β-lactoglobuline à 0,5 g/l. acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M.

Tableau XXII-

Température	Expression de la fixation	pH			
		4,0	5,0	6,0	7,0
4°C	IFP	19	14,5	22	20
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	41	29,5	51,2	25
20°C	IFP	20	16	24	21,6
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	43,16	32,72	55,9	27

Variation de l'importance de la fixation de l'ac. ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la température.

Tableau XXIII-

Température	β-lactoglobuline	(M') 235 pH			
		4,0	5,0	6,0	7,0
4°C	native	-1492 ± 100	-1053 ± 100	-1756 ± 100	-1682 ± 100
	complexe β-lacto-globuline + vitamine C	-878 ± 100	-2107 ± 100	-2985 ± 100	-3248 ± 100
20°C	native	-1229 ± 100	-1141 ± 100	-1417 ± 100	-1229 ± 100
	complexe β-lacto-globuline + vitamine C	-1492 ± 100	-1417 ± 100	-1848 ± 100	-1682 ± 100

Variation de l'amplitude de l'extrêmum négatif $(\bar{M}')$ 235 de l'effet Cotton du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique en fonction de la température et du pH.

que l'amplitude de l'extrêmum négatif du complexe avec la sérum albumine augmentait dans des conditions de température.

6-3- Etude spectrofluorimétrique.

Les résultats concernant l'étude spectrofluorimétrique sont exposés Fig. (24). Ils nous montrent que :

- Pour la protéine native, l'intensité de la fluorescence augmente avec la température pour une même valeur du pH.

- Il en est de même après la fixation de la vitamine C. Pour chaque pH étudié, l'écart entre l'intensité maximum de fluorescence de la protéine native et celle du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique est plus important à + 20 qu'à +4°C.

Ce fait pourrait simplement traduire l'augmentation de la fixation avec la température. On retrouve donc ici des résultats analogues à ceux concernant la sérum albumine (cf. Fig. 7).

VII- Fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline ayant préalablement subi un traitement thermique.

7.-1- Généralités.

Si l'on élève la température des solutions de β-lactoglobuline et d'acide ascorbique, ce qui, en principe, devrait augmenter l'importance de la fixation on se trouve confronté à de nouveaux problèmes. D'une part l'instabilité de l'acide ascorbique entraînerait des pertes considérables pendant les opérations de fixation au contact de l'air, et d'autre part au dessus d'un certain seuil de température, le traitement thermique est susceptible de dénaturer la protéine. Du fait de la désorganisation structurale, des sites protégés deviennent alors exposés, ce qui devrait accroître les possibilités de fixation du ligand.

D'un point de vue pratique, il pourrait

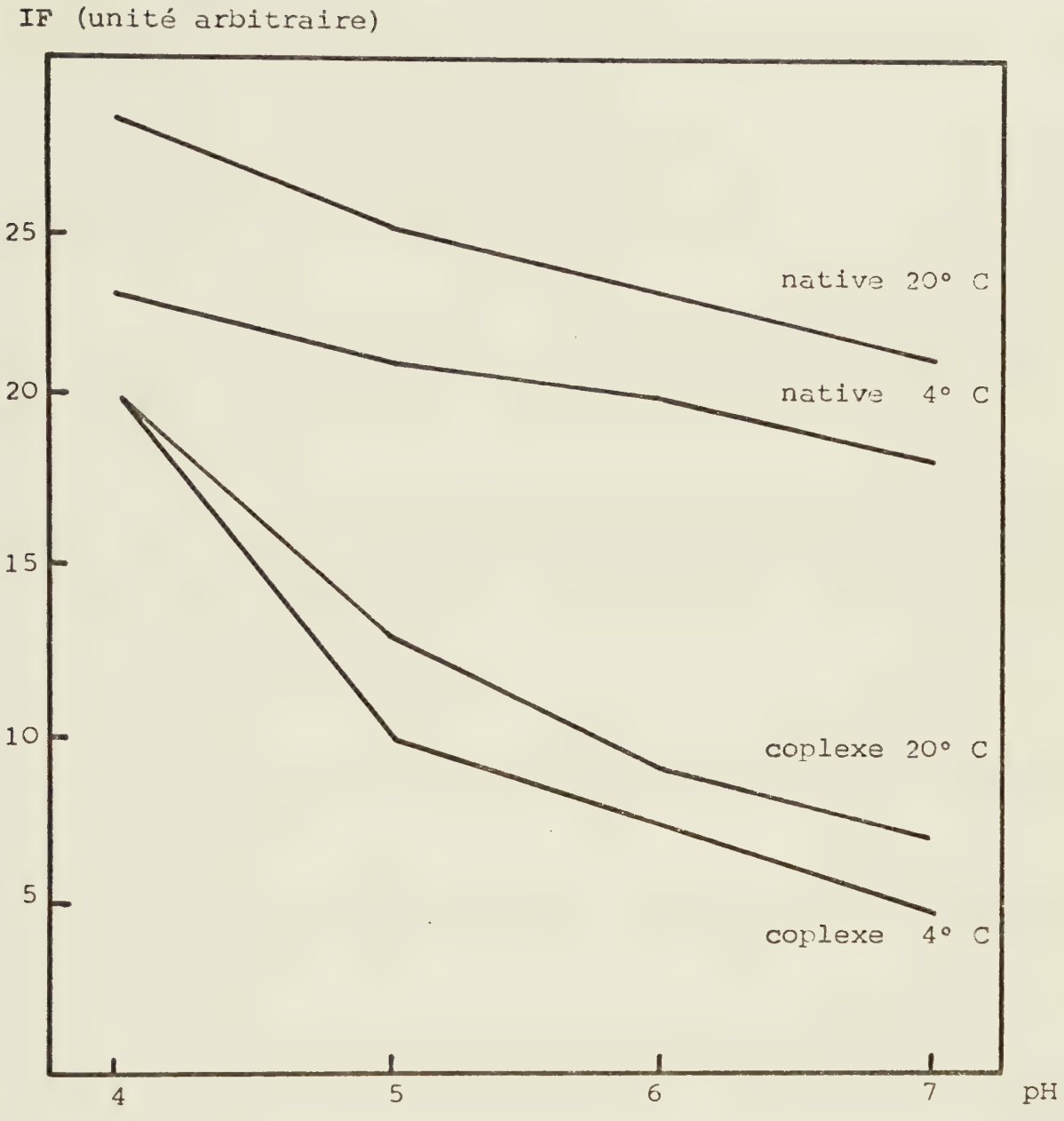


Figure 24- Variations comparées en fonction de la température et du pH de maximum de l'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après fixation d'acide ascorbique. β-lactoglobuline à 0,5 g/l. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M.

donc devenir intéressant de traiter des solutions protéiques préalablement thermodénaturées. On peut même envisager le cas où la protéine aurait été préalablement précipitée par chauffage d'une solution diluée.

Une expérimentation a été conduite dans cette optique. La solution de β-lactoglobuline à 1g/litre amenée au pH souhaité est portée à une température comprise entre 60 et 90°C pendant une heure en ampoule scellée.

Après refroidissement à +20°C, un léger réajustement du pH est nécessaire seulement quand la solution chauffée se trouvait primitivement à pH=5,0 et 6,0.

Sans tenir compte d'une éventuelle précipitation partielle, le contenu de l'ampoule est mélangé au même volume d'une solution d'acide ascorbique de 5×10^{-3}M. L'importance de la fixation est évaluée comme à l'accoutumée.

7-2- Résultats.

Ils sont exposés dans le tableau XXIV et Fig. 25 et montrent par rapport au témoin maintenu à +20°C que :

- La fixation augmente légérement avec la température atteinteau cours du traitement thermique préalable de la protéine, quel que soit le pH étudié.

- L'augmentation de la fixation avec la température atteinte au cours du traitement thermique préalable ne paraît pas modifiée par la présence d'un précipité, et cette constatation pourrait revêtir une grande importance pratique.

VIII- Variation de la fixation en fonction de la concentration vitaminique.

Il est intéressant de vérifier si le fait d'augmenter la concentration de la vitamine C est susceptible d'accroître le taux de fixation de ce composé sur la β-lactoglobuline comme c'était le cas pour la sérum albumine.

Tableau XXIV-

pH	Expression de la fixation	Température en °C				
		20°C	60°C	70°C	80°C	90°C
4,0	IFP	20	22	24,5	26	27
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	43,16	47,5	52,9	56,1	58,2
5,0	IFP	16	18	20	22(·)	23(·)
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	32,72	36,8	41	45	47
6,0	IFP	24	24,5	26	27(·)	29(·)
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	55,9	57	60,56	62,8	68
7,0	IFP	21,6	22	22,5	23	24
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	27	27,50	28	28,75	30

(·) = présence d'un précipité

Importance de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline préalablement amenée au pH expérimental et chauffée à diverses températures puis refroidie avant son contact avec l'acide ascorbique.

Figure 25-a- Variation de l'IFP de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline préalablement chauffée à diverses températures puis refroidie avant son contact avec l'acide ascorbique.

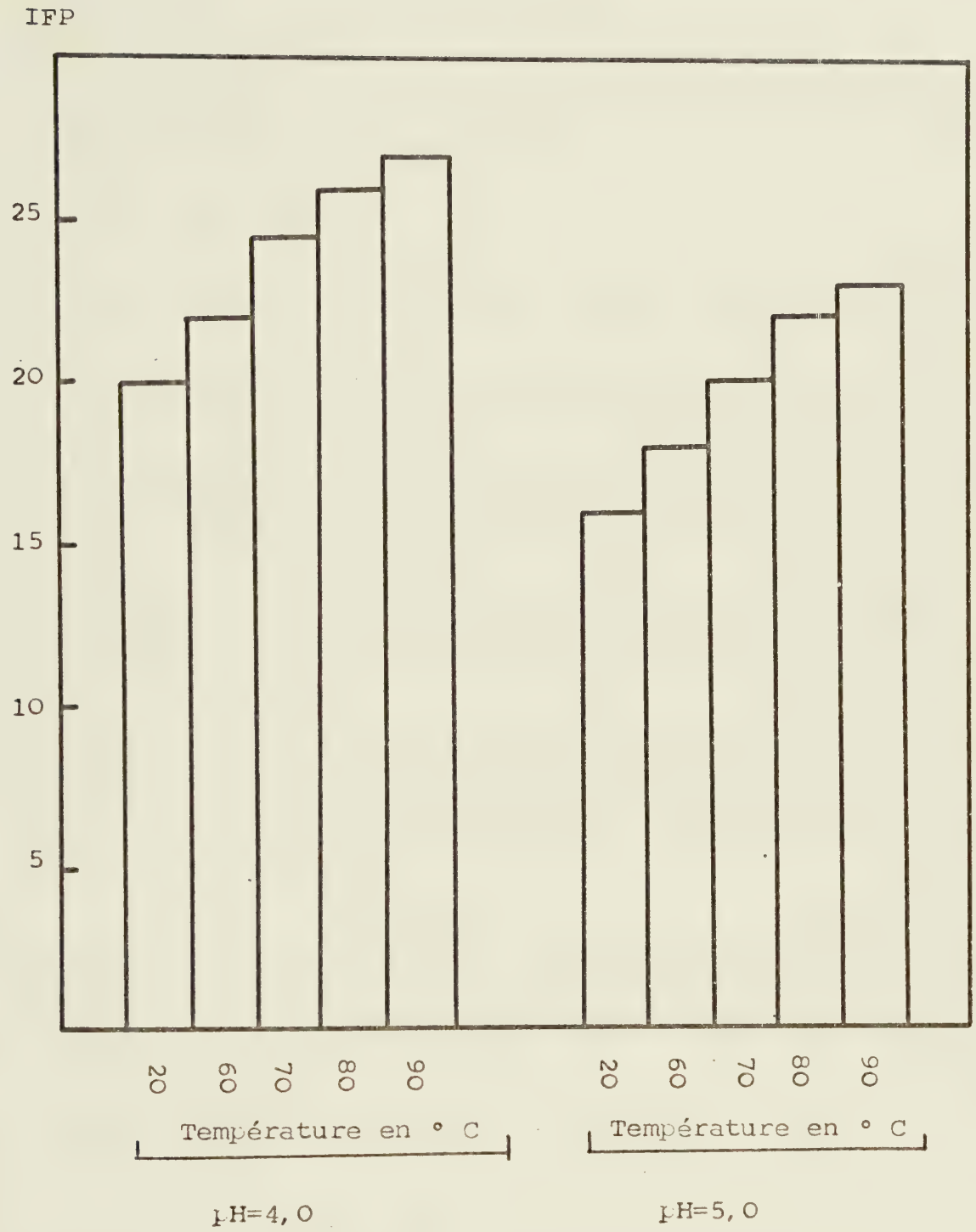


Figure 25-b- Variation de l'IFP de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline préalablement chauffée à diverses températures puis refroidie avant son contact avec l'acide ascorbique.

L'expérimentation a été conduite à pH= 4,0 - 5,0 - 6,0 et 7,0, à la température de +20°C. Les concentrations vitaminiques finales utilisées sont $1,25 \times 10^{-3}$M - $2,5 \times 10^{-3}$M - 5×10^{-3}M et 10^{-2}M. Pour chacune des opérations, la concentration de la protéine est toujours 0,5 g/l.

——— 8-1-Résultats.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XXV et Fig. 26. On note que :

- Pour une même valeur du pH, la fixation croît quand la concentration vitaminique augmente.

- Pour chaque concentration vitaminique étudiée, une augmentation du pH entraîne un accroissement de la fixation sauf au voisinage du point isoélectrique.

Tous les résultats précédents, détermination de la fixation en foncton de la température, du pH et de la concentration vitaminique sont en accord avec ceux obtenus sur la sérum albumine.

Rappelons que TESSIER (59) et VALENTIN (57), qui étudiaient la fixation de la flavine mono-nucléotide sur l'ovalbumine et la β-lactoglobuline de brebis respectivement, avaient déjà mis en évidence un phénomène du même ordre.

Il convient encore de remarquer que la valeur du rapport acide ascorbique fixé sur la β-lactoglobuline / acide ascorbique présent dans le milieu initial x 100, décroît lorsqu'augmente la concentration en acide ascorbique (fig. 27).

——— 8-2- Evaluation du nombre de sites de fixation par la méthode de SCATCHARD.

Le tableau XXV a fait état du nombre de molécules d'acide ascorbique fixées sur la β-lactoglobuline, mais n'indique pas le nombre maximum des sites de cette protéine susceptibles de se trouver impliqués dans ce processus de fixation.

Afin d'évaluer ce nombre, on a appliqué

Tableau XXV-a

pH	Expression de la fixation	Concentration vitaminique			
		$1,25 \times 10^{-3}$ M	$2,5 \times 10^{-3}$ M	5×10^{-3} M	10^{-2} M
4,0	IFP	11,6	20	26	28
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	25	43,16	56,1	60,4
5,0	IFP	11,2	16	22	24
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	22,9	32,7	45	49
6,0	IFP	19,2	24	42	82
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	44,7	55,9	97,8	191
7,0	IFP	13,2	21,6	32	53,2
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	16,5	27	40	66,75

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration vitaminique et du pH. (β-lactoglobuline à 0,5 g/l. Température 20°C.)

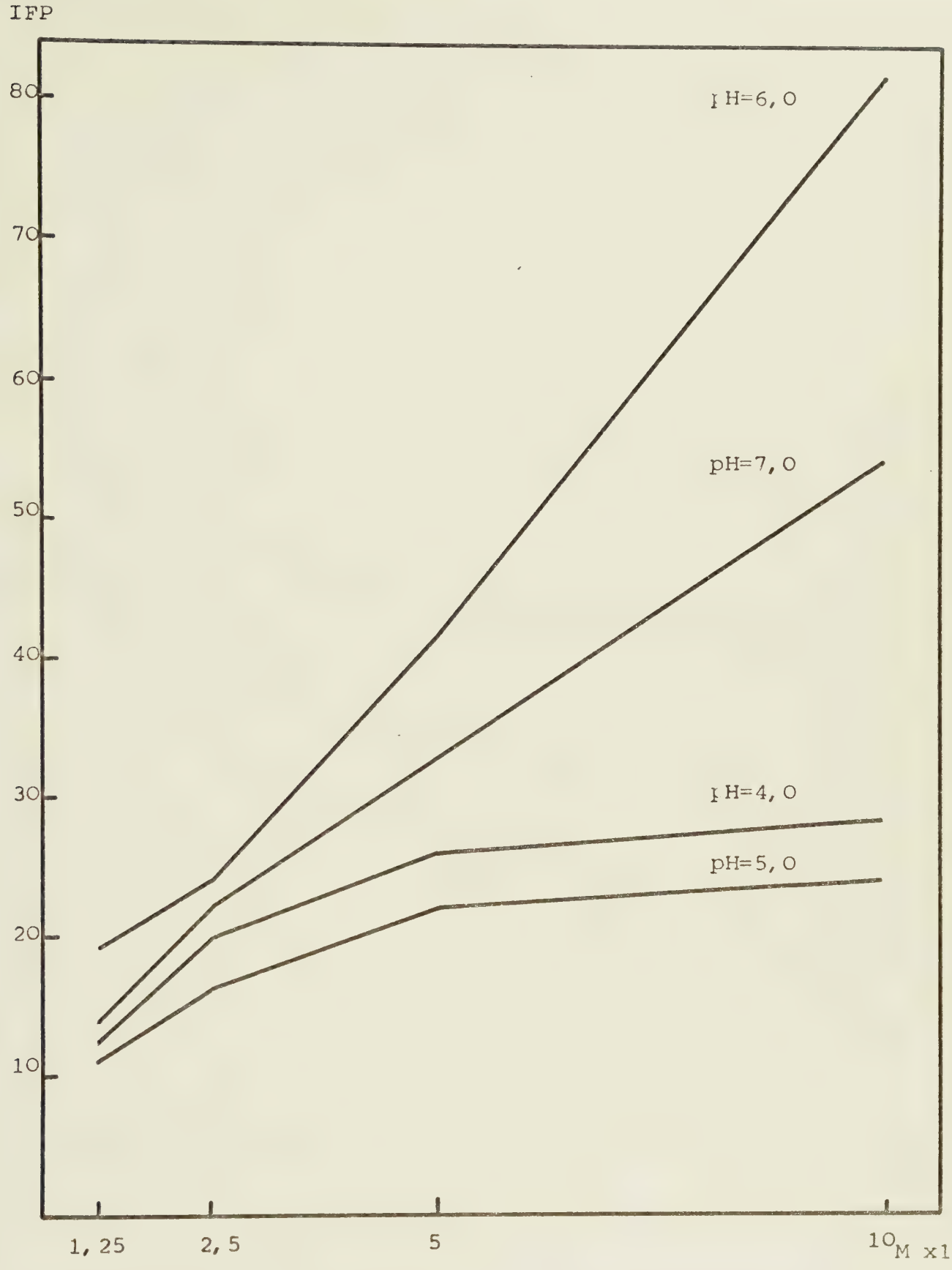


Figure 26- Variations de l'IFP en fonction de la concentration en acide ascorbique et du pH. β-lactoglobuline à 0,5 g/l. Température à +20°C.

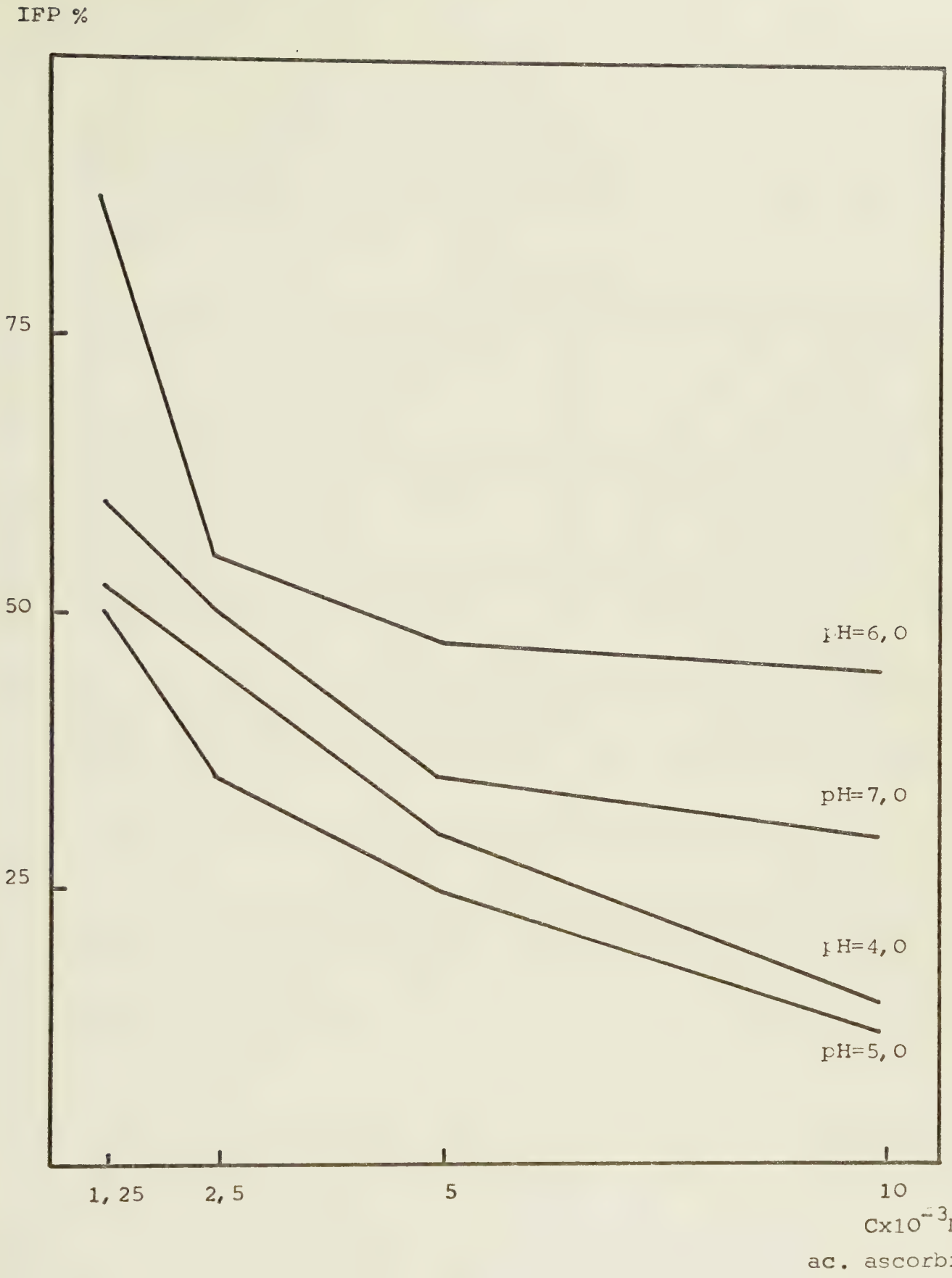


Figure 27- Pourcentage de fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline, en fonction de sa concentration initiale et du pH.

la représentation de SCATCHARD. Comme dans le cas de la fixation sur la sérum albumine, cette équation conduit à une représentation linéaire et le nombre des sites peut, ici encore, être calculé avec une bonne précision. Les résultats sont groupés dans le tableau suivant.

Tableau XXV - b.

pH	n = nombre de sites occupés /mole de β-lactoglobuline	K = Constante d'équilibre ou de dissociation
4, 0	85	$2,5 \times 10^{-3}$
5, 0	60	$1,33 \times 10^{-3}$
6, 0	130	$1,33 \times 10^{-3}$
7, 0	70	3×10^{-3}

Les sites sur lesquels l'ac. ascorbique peut se fixer sont moins nombreux sur la β-lactoglobuline, même en tenant compte des variations de son poids moléculaire en fonction du pH, que sur la sérum albumine.

8-3- Etude spectropolarimétrique.

D'une manière générale, et quel que soit le pH, la fixation de quantités croissantes d'acide ascorbique s'accompagne d'une augmentation de l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton c'est-à-dire d'une augmentation de l'hélicité α du système protéine - ligand. On retrouve ici un comportement globalement similaire à celui de la sérum albumine.

Dans le cas présent, l'augmentation de l'hélicité du système précité n'obéit pas à une loi simple puiqu'elle est plus élevée pour une concentration initiale d'acide ascorbique de 5×10^{-3} M que pour une concentration double.

Cette légère modification de comportement reflète les différences fondamentales de structure entre la sérum albumine et la β-lactoglobuline. Fig. 28 et 29.

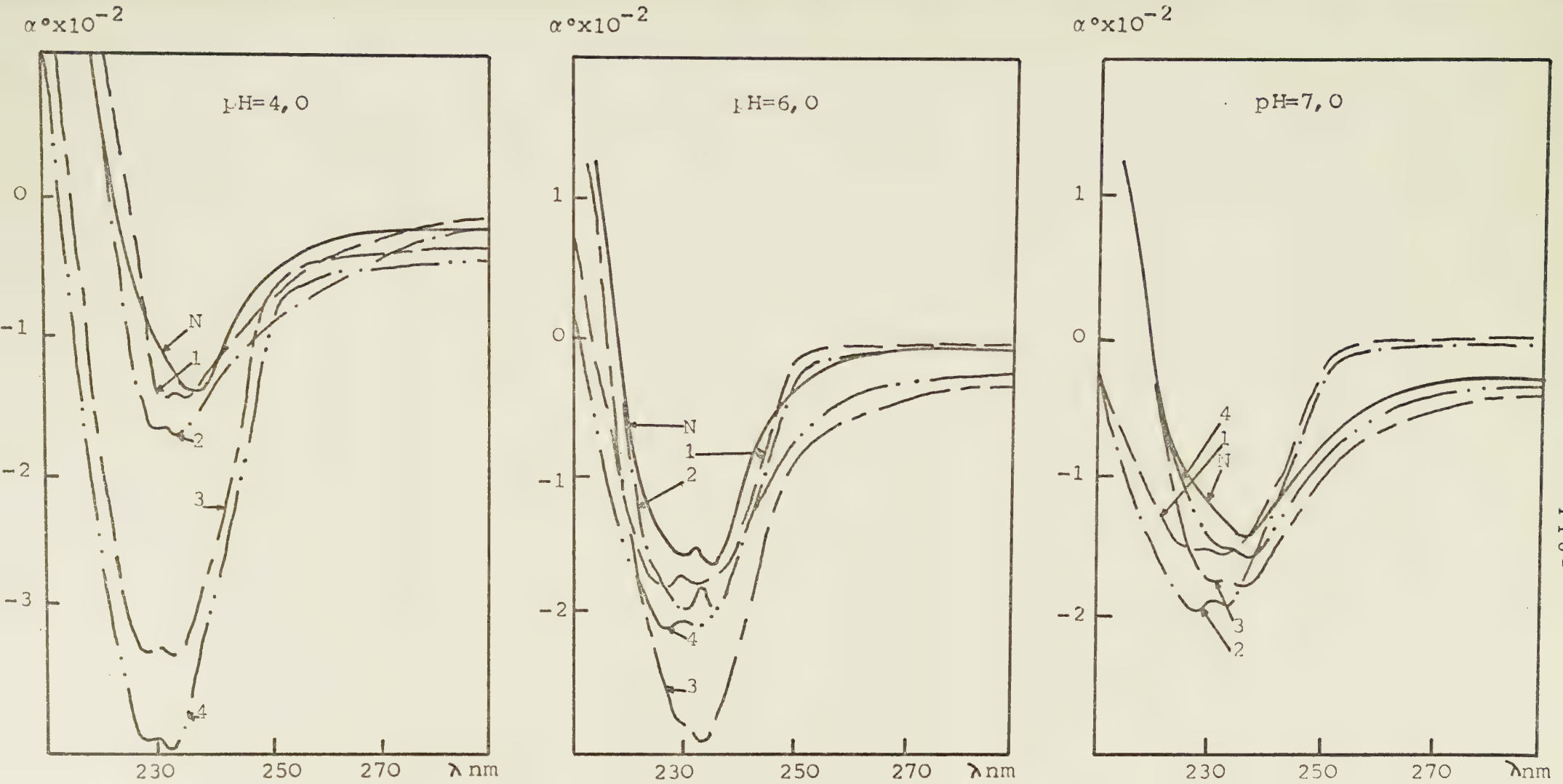


Figure 28- 29- Comparaison des spectres de DOR des solutions de -lactoglobuline native et du complexe -lactoglobuline + acide ascorbique en fonction de diverses concentrations en acide ascorbique. N : native - 1 : 1,25 x 10^{-3}M - 2 : 2,5 x 10^{-3}M. 3:5x 10^{-3}M - 4 : 10^{-2}M.

8-4- Etude spectrofluorimétrique.

Les résultats (fig. 30) montrent que l'intensité de fluorescence du complexe demeure toujours inférieure à celle de la β-lactoglobuline native.

Pour des concentrations inférieures ou égales à $2,5 \times 10^{-3}$ M d'acide ascorbique dans le mélange initial, l'intensité de fluorescence diminue quand le pH croît. Cette diminution est d'autant plus marquée que la fixation elle-même est plus importante.

Pour des concentrations égales ou supérieures à 5×10^{-3} M d'acide ascorbique, l'intensité de fluorescence diminue comme précédemment à pH = 4,0 et 5,0 mais elle augmente à pH = 6,0 et 7,0.

Pour expliquer ce comportement, on pourrait émettre une hypothèse selon laquelle la fixation d'une quantité croissante d'acide ascorbique sur la chaîne protéique à pH = 6,0 et 7,0 s'accompagnerait de modifications structurales ayant pour résultat d'"exposer" des restes de tryptophane.

Les mesures de l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton aux mêmes pH et concentrations vitaminiques montrent qu'effectivement des modifications structurales sont susceptibles de se produire mais rien ne permettrait alors de supposer que des restes de tryptophane puissent être impliqués dans le processus de modification.

De tels faits n'avaient pas été mis en évidence lors de la fixation d'acide ascorbique sur la sérum albumine.

IX- Influence des sels sur les possibilités et modalités de fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline bovine.

9-1- Généralités.

Jusqu'à présent la fixation de l'acide ascorbique sur la protéine avait été réalisée en milieu de salinité pratiquement nulle puisque la pH des solutions était ajusté par de très petites quantités de HCl ou NaOH.

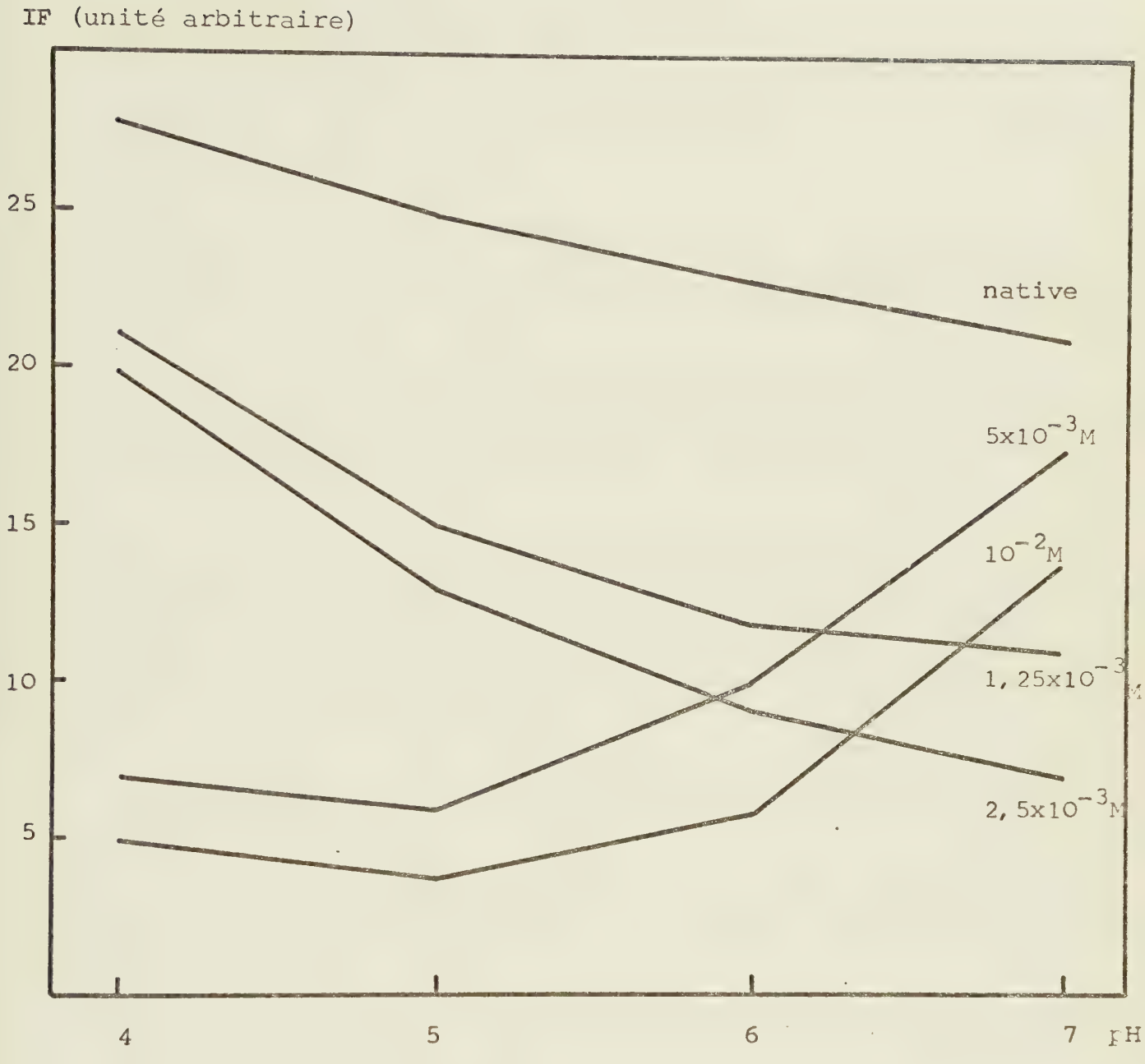


Figure 30- Variations comparées en fonction de la concentration vitaminique et du pH, du maximum de l'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après fixation d'acide ascorbique - β-lactoglobuline à 0,5 g/l. Température +20°C.

Les éventuelles répercussions de la présence de sels dans le milieu où se forme le complexe β-lactoglobuline—acide ascorbique, vont être maintenant envisagées. Rappelons que la présence de NaCl diminuait l'importance de la fixation de l'acide ascorbique sur la sérum albumine et que l'expérimentation s'était alors limitée à ce seul composé salin.

En principe le sel le plus abondamment répandu dans les liquides biologiques susceptibles de servir de sources de matières premières protéiques utilisables pour la fixation de l'acide ascorbique est NaCl.

Il est cependant possible de supposer qu'à la suite de divers traitements industriels, d'autres sels soient présents dans le milieu où s'opère la fixation de l'acide ascorbique sur une protéine.

La question se pose alors de savoir si une concentration saline du milieu favorise ou au contraire limite la fixation du ligand ascorbique comme elle le fait dans le cas de la fixation de Riboflavine -mononucléotide (62). Mais en ce domaine, il importe aussi de connaître les propriétés éventuellement différentes de divers anions et cations.

La meilleure méthode pour rechercher la responsabilité comparée de divers cations semble être d'opérer en présence de divers sels du même anion.

Présentement, une telle étude au niveau des métaux alcalins a donc été comparativement effectuée sur LiCl, NaCl et KCl.

Lorsque l'on souhaîte observer le rôle propre à l'anion, il suffit de comparer divers sels possédant le même cation. Dans un but de simplification, ce cation est évidemment Na^+.

X- Répercussion de la présence de cations alcalins, sur l'amplitude de la fixation.

Dans tous les cas le milieu réactionnel consiste en un mélange de solutions iso-hyalines de β-lactoglobuline et de vitamine C amenées au même pH. La concentration finale en protéine est toujours 0,5g/l

et la concentration vitaminique est $2,5 \times 10^{-3}$ M.

Les sels employés sont LiCl, NaCl, KCl aux concentrations de $\frac{1}{16}$ M - $\frac{1}{8}$ M - $\frac{1}{4}$ M et $\frac{1}{2}$ M.

Dans la limite des présentes conditions expérimentales, toutes les solutions testées sont limpides.

10-1- Résultats.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux XXVI- XXVII- XXVIII et XXIX et fig. 31, 32, 33 et 34. A titre de comparaison, la valeur de l'IFP de la β-lactoglobuline en solution dépourvue de sel et aux mêmes pH, est signalée dans les mêmes tableaux. Pour des concentrations salines allant de $\frac{1}{16}$ M à $\frac{1}{2}$ Molaire, les valeurs de l'IFP obtenues sont toujours faibles par rapport à celles observées en l'absence de sel. La présence des ions Li^+, Na^+, K^+ paraît donc perturber considérablement le mécanisme de fixation de l'acide ascorbique sur la protéine.

Dans le cas de NaCl, l'IFP s'annule pour une concentration $\frac{1}{2}$M. Le même effet résulte de la présence de plus faibles concentrations de K^+ et Li^+ (respectivement $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{8}$ M).

Pour une même concentration molaire d'un sel alcalin d'un même acide, l'importance de la fixation dépend donc essentiellement de la nature du cation en cause.

Une opposition croissante à la fixation se manifeste dans l'ordre croissant $Na^+ < K^+ < Li^+$.

Si l'on considère l'un quelconque des sels utilisés la fixation est d'autant plus limitée que sa concentration est élevée. La β-lactoglobuline est une des rares protéines avec la myosine et la zéine capable de se lier avec les ions Na^+ et K^+ (60). Dans tous les cas, une telle fixation résulterait de la chélation du cation par les groupes carboxyl, imidazol ou aminé (61).

Tableau XXVI-

Sel	Concentration molaire en sel	IFP	Moles d'ac. ascorbique fixées/mole de β-lactoglobuline
NaCl	0	20	43,16
	1/16 M	8	17,26
	1/8 M	4	8,63
	1/4 M	1,6	3,46
	1/2 M	0	0
KCl	0	20	43,16
	1/16 M	4	8,63
	1/8 M	0,8	1,73
	1/4 M	0	0
LiCl	0	20	43,16
	1/16 M	1	2,15
	1/8 M	0	0

Variation de la fixation de l'ac. ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la salinité ambiante. Température 20°C.
Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M ; β-lactoglobuline 0,5 g/l. Etude réalisée à pH = 4,0.

Tableau XXVII-

Sel	Concentration molaire en sel	IFP	Moles d'ac. ascorbique fixées/mole de β-lactoglobuline
NaCl	0	16	32,72
	1/16 M	8	16,36
	1/8 M	6	12,2
	1/4 M	4	8,1
	1/2 M	0	0
KCl	0	16	32,72
	1/16 M	5	10,2
	1/8 M	2,5	5,1
	1/4 M	0	0
LiCl	0	16	32,72
	1/16 M	2,6	5,3
	1/8 M	0	0

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline, en fonction de la salinité ambiante. Etude réalisée à pH = 5,0.

Tableau XXVIII-

Sel	Concentration molaire en sel	IFP	Moles d'ac. ascorbique fixées/mole de β-lactoglobuline
NaCl	0	24	55,9
	1/16M	13,6	31,68
	1/8M	6,4	14,8
	1/4M	5	11,65
	1/2M	0	0
KCl	0	24	55,9
	1/16M	6	13,9
	1/8M	3,2	7,4
	1/4M	0	0
LiCl	0	24	55,9
	1/16M	3,5	7,9
	1/8M	0	0

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la salinité ambiante
Etude réalisée à pH = 6,0.

Tableau XXIX -

Sel	Concentration molaire en sel	IFP	Moles d'ac. ascorbique fixées/mole de β-lactoglobuline
NaCl	0	21,6	27
	1/16 M	7,6	9,5
	1/8 M	3,6	4,5
	1/4 M	3,6	4,5
	1/2 M	0	0
KCl	0	21,6	27
	1/16 M	1,8	2,25
	1/8 M	0,6	0,8
	1/4 M	0	0
LiCl	0	21,6	27
	1/16 M	0,8	1
	1/8 M	0	0

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la salinité ambiante. Etude réalisée à pH = 7,0.

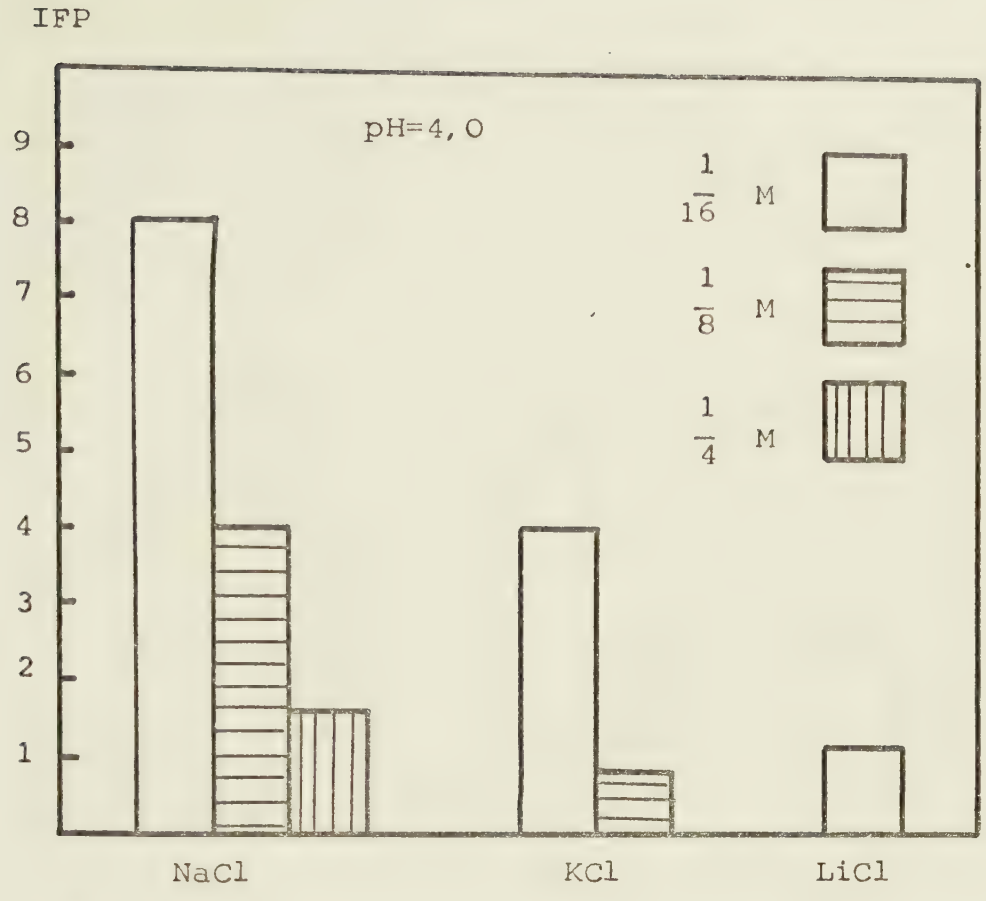
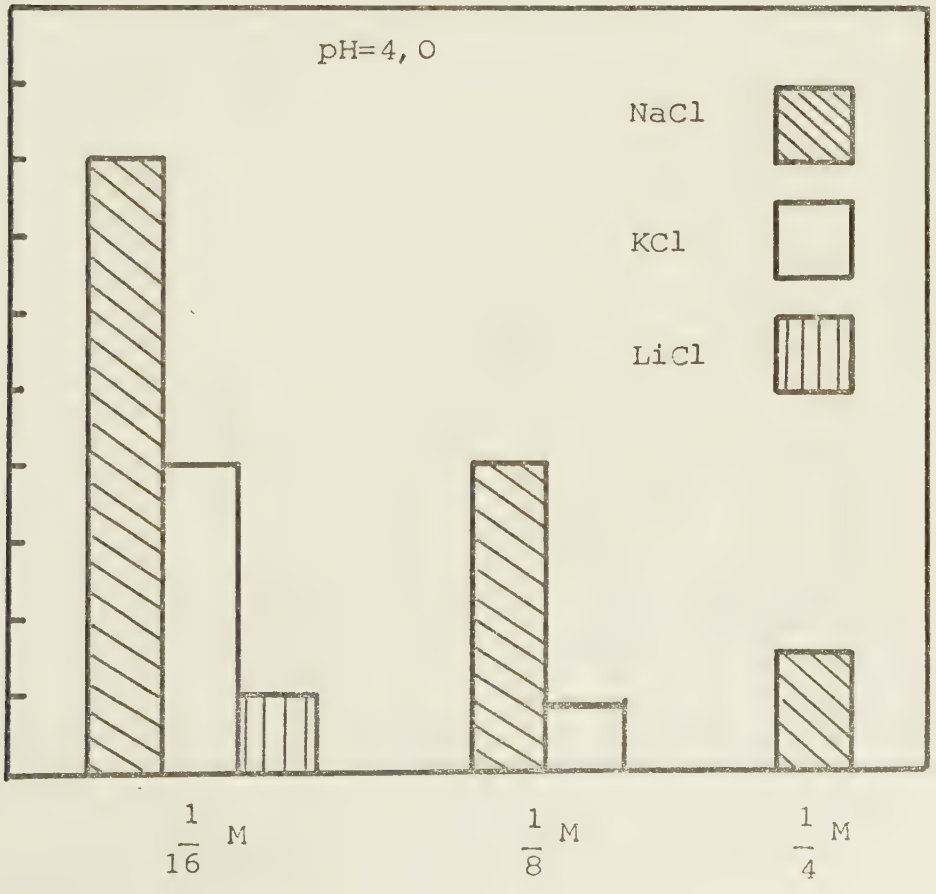


Figure 31- Légende p. 122.



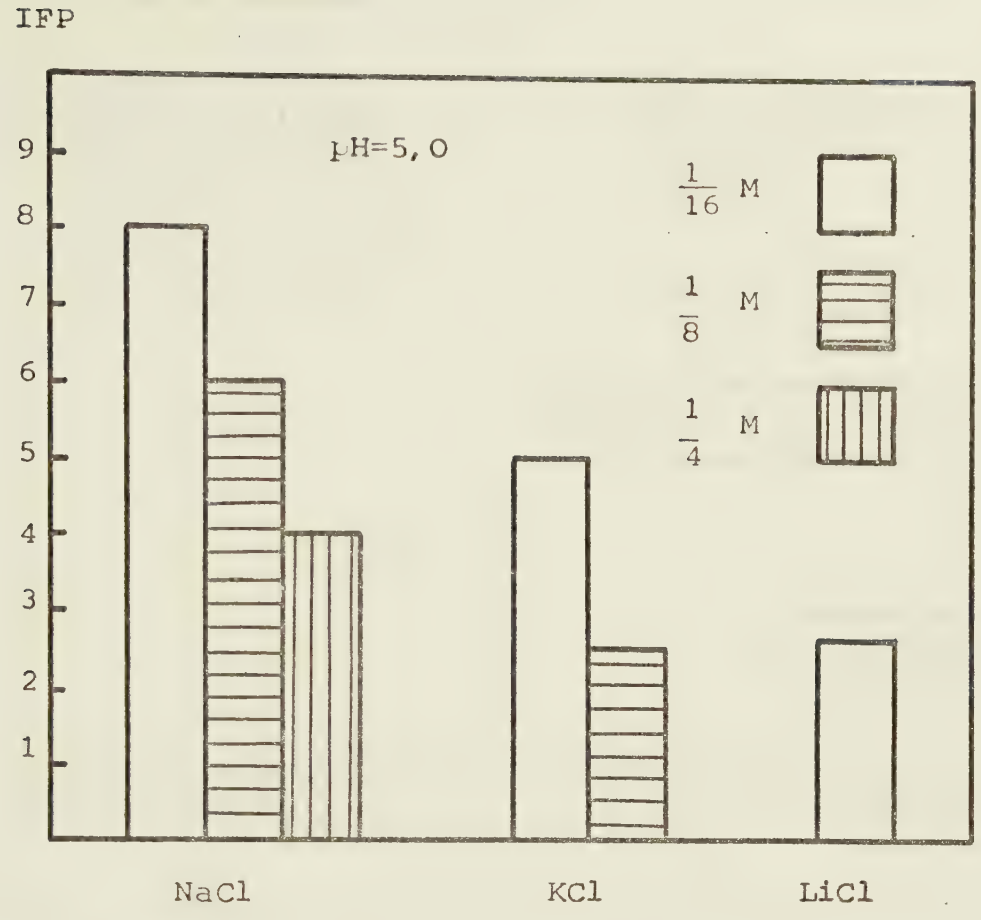
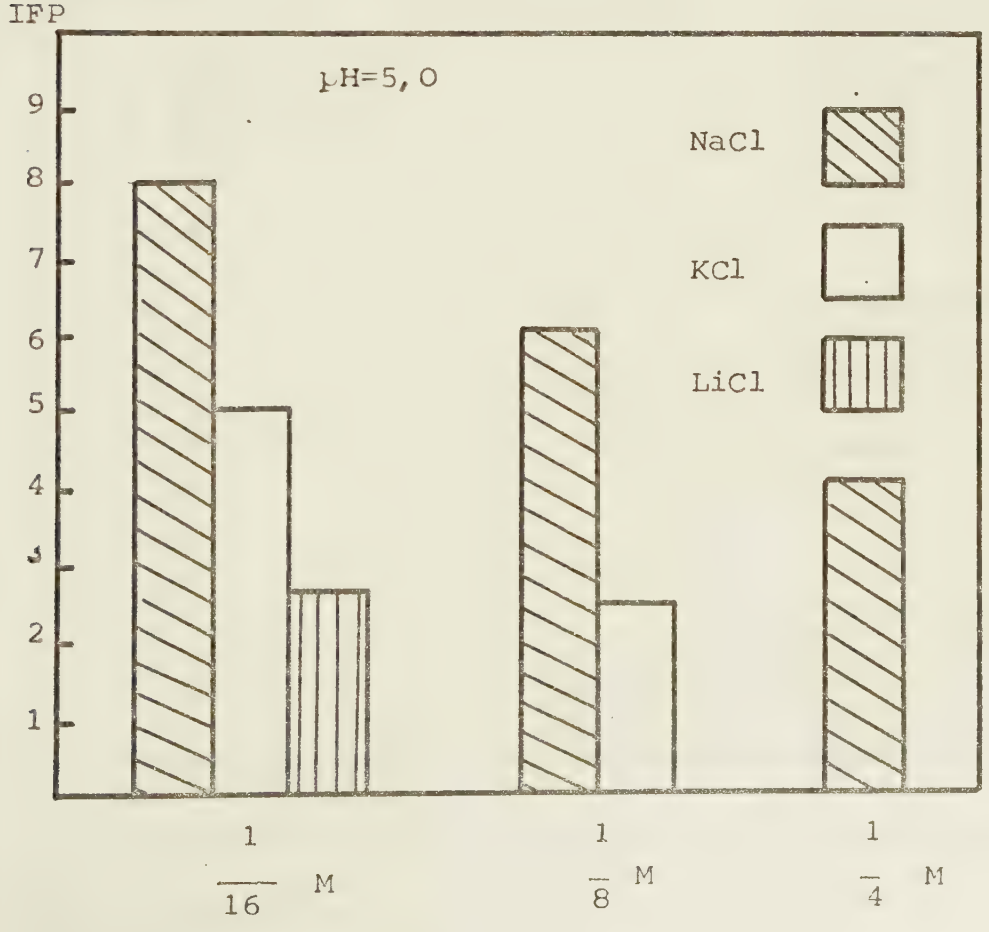


Figure 32- Légende p. 122.



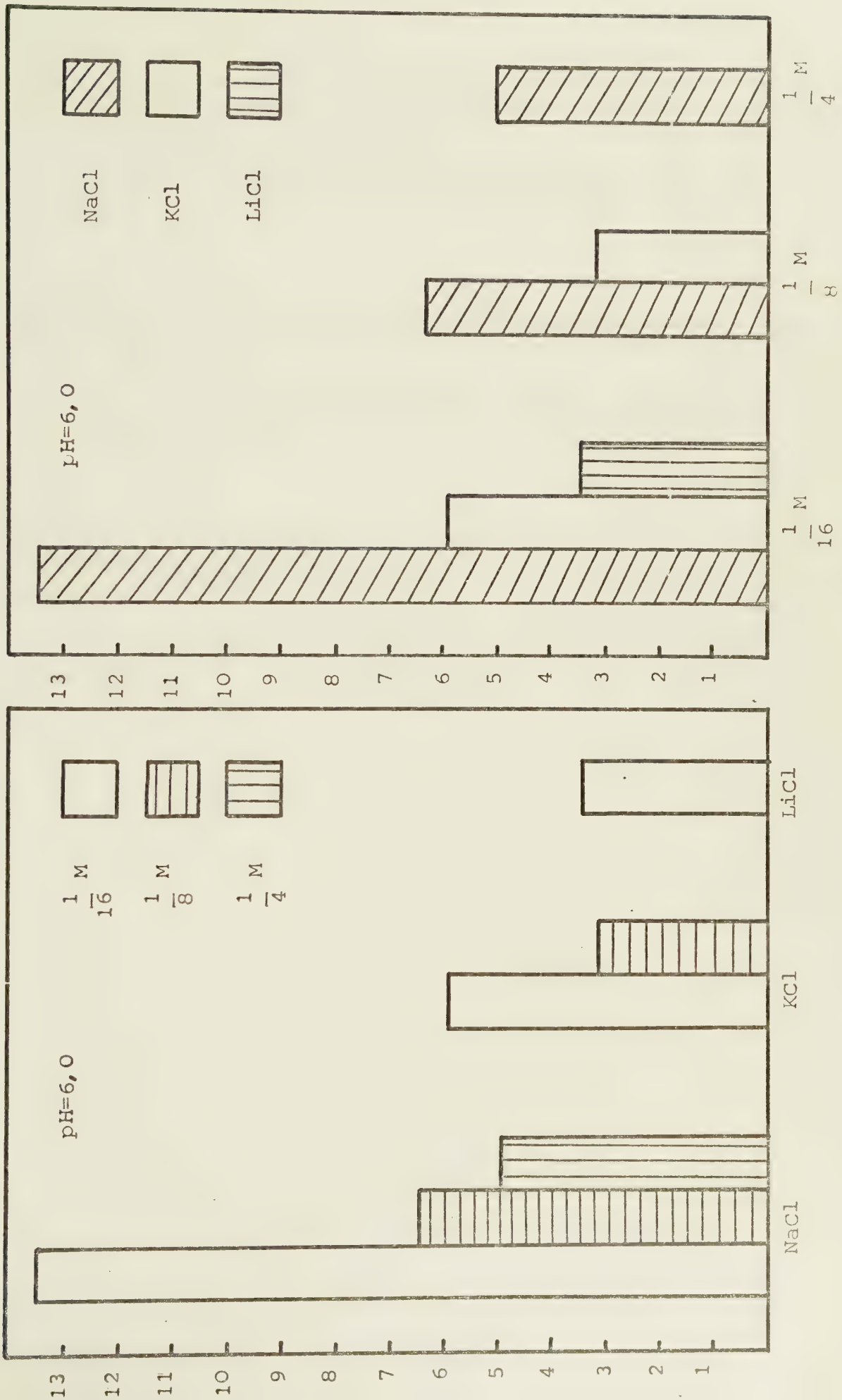


Figure 33- Légende p. 122.

Légende de la
Figure 31- Variation de l'IFP de la vitamine C sur la β-lactoglobuline en fonction de la salinité du milieu ambiant.
A - pour chacune des 3 espèces salines considérées.
B - pour des concentrations en sels déterminées.
pH = 4, 0

Légende de la
Figure 32- Variation de l'IFP de la vitamine C sur la β-lactoglobuline en fonction de la salinité du milieu ambiant.
A- pour chacune des 3 espèces salines considérées.
B - pour des concentrations en sels déterminées.
pH = 5, O

Légende de la
Figure 33- Variation de l'IFP de la vitamine C sur la β-lactoglobulin en fonction de la salinité du milieu ambiant.
A- pour chacune des 3 espèces salines considérées.
B- pour des concentrations en sels déterminées.
pH = 6, 0

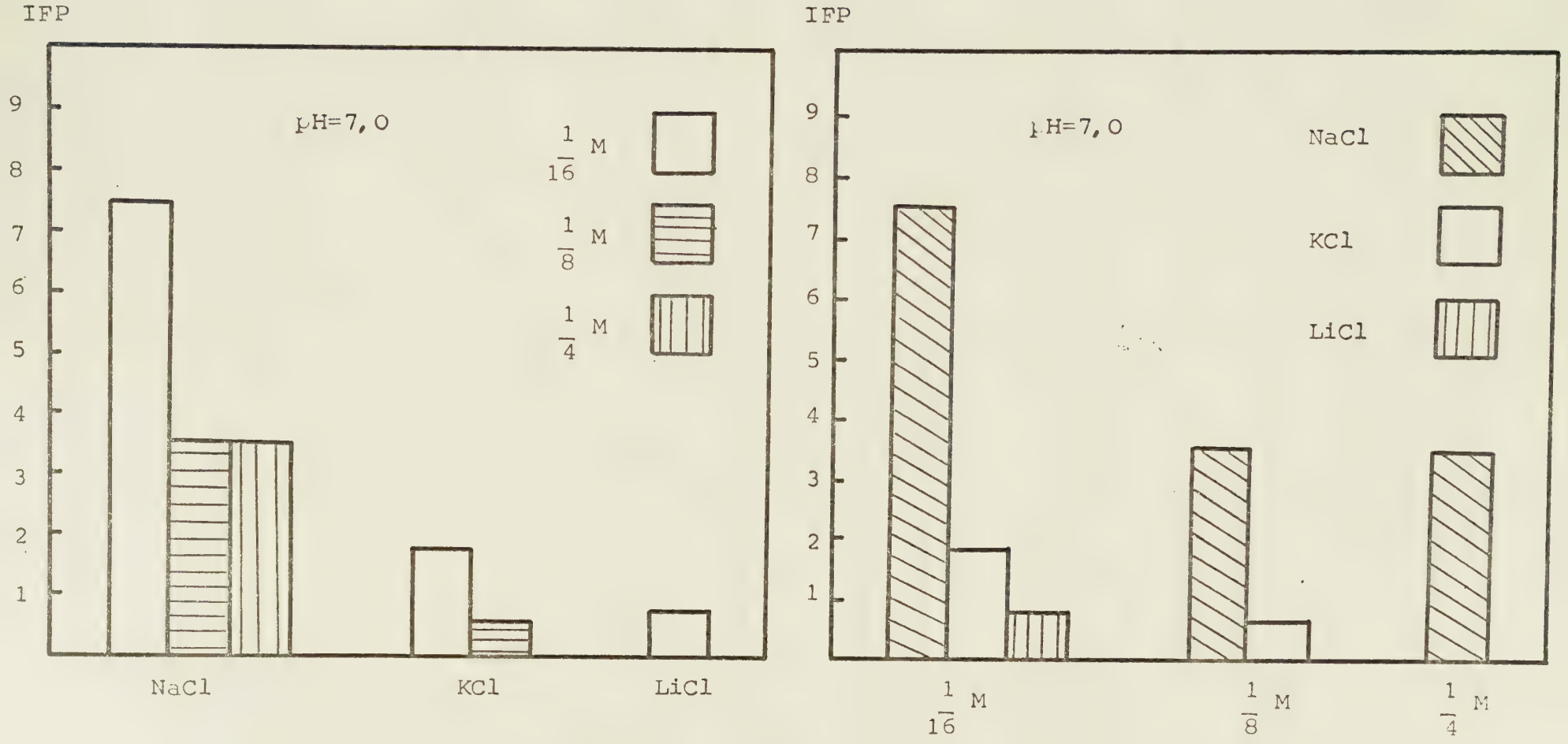


Figure 34- Variation de l'IFP de la vitamine C sur la β-lactoglobuline en fonction de la salinité du milieu ambiant.
A- pour chacune des 3 espèces salines considérées
B- pour des concentrations en sels déterminées. pH = 7,0

Si l'on admet que l'occupation préalable de tels sites empêche la fixation de l'acide ascorbique, on est conduit à supposer qu'en l'absence de sel, la vitamine C se fixe sur la β-lactoglobuline au niveau de l'un ou plusieurs des groupes précités.

Ces résultats confirment ceux obtenus par VALENTIN (62), sur la β-lactoglobuline de brebis, lorsque le ligand est la flavine mono-nucléotide.

10-2- Etude spectropolarimétique.

L'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton de la β-lactoglobuline augmente lorsque la concentration en NaCl augmente dans le milieu et aussi lorsque la quantité d'acide ascorbique qui s'y trouve fixée s'accroît.

En principe, on s'attend donc à une augmentation de l'amplitude de l'extrêmum négatif par rapport à la protéine native lorsque ces deux facteurs sont réunis, et c'est ce que l'expérimentation confirme d'une façon générale.

En fait, si l'on compare l'amplitude de l'extrêmum négatif relatif à la β-lactoglobuline en présence de NaCl à celle du complexe β-lactoglobuline - acide ascorbique formé en présence de la même quantité de sel, on s'aperçoit qu'il se produit toujours une augmentation de cette amplitude, sauf à pH = 4,0, lorsque la concentration saline est faible -($\frac{1}{16}$ M).

Le même phénomène se produit lorsque l'on remplace Na^+ par K^+, mais pas par Li^+. Dans ce dernier cas, l'augmentation précitée se manifeste à tous les pH étudiés. Fig. 35, 36, 37, 38, 39 et 40.

10-3- Etude spectrofluorimétrique.

Par rapport à celle de la solution saline de β-lactoglobuline, l'intensité de fluorescence de la solution du complexe formé en milieu salin est toujours diminué, quel que soient le pH et la concentration saline. Cette règle est valable pour les trois cations étudiés

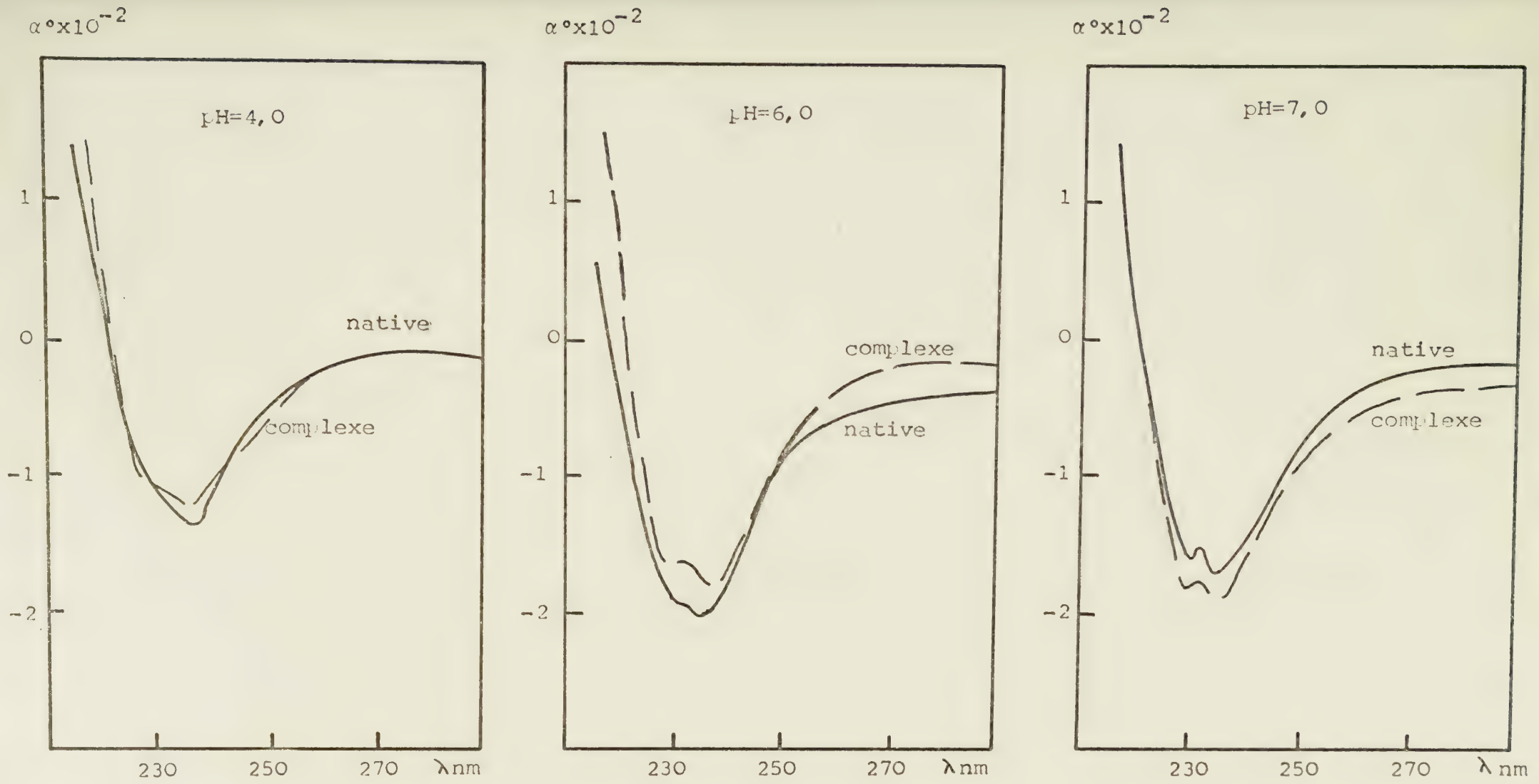


Figure 35- Comparaison des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline dans NaCl et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique. Concentration en NaCl (1/16M). Acide ascorbique 2,5 x 10^{-3}M . β-lactoglobuline 0,5 g/litre.

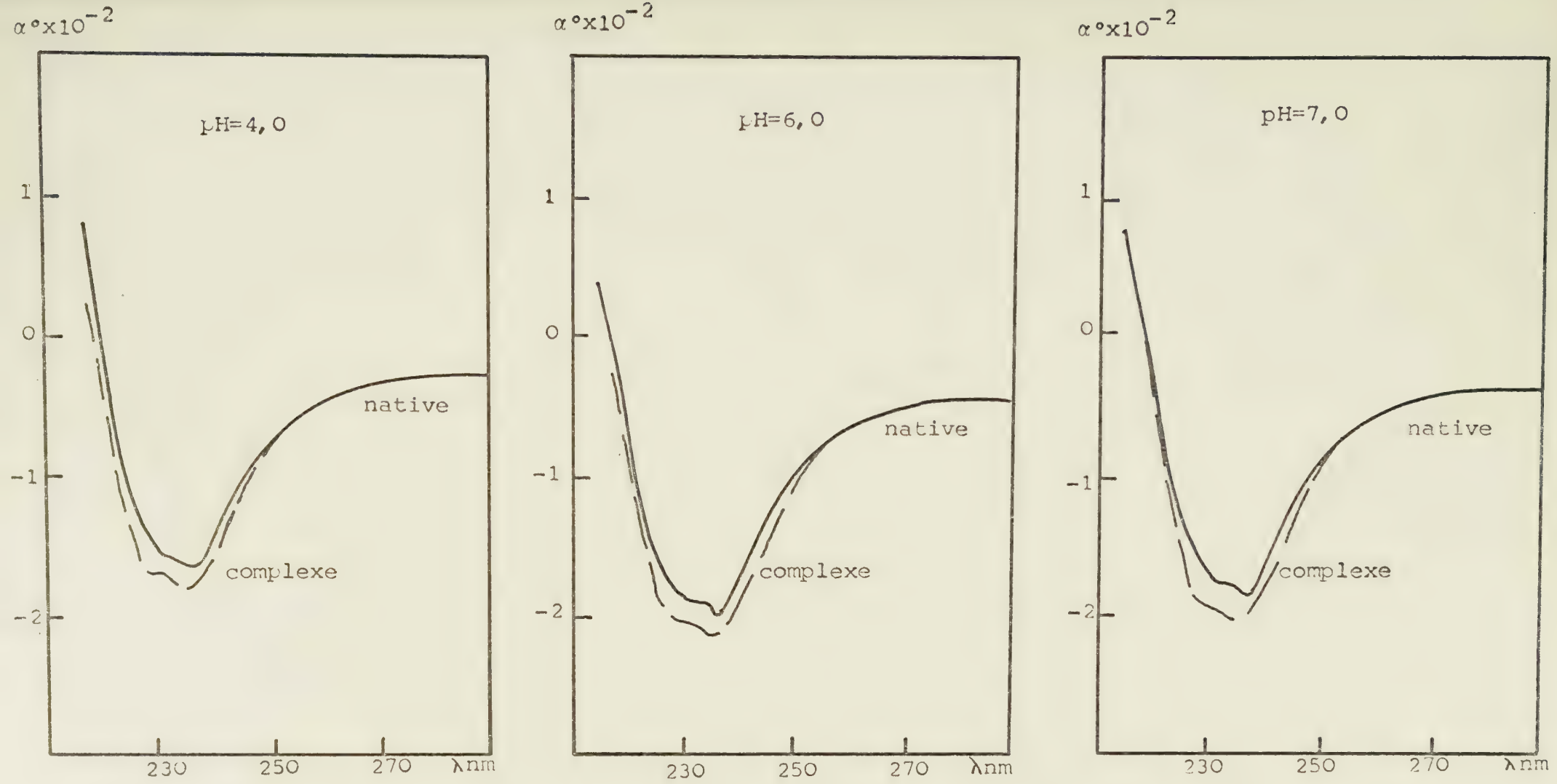


Figure 36- Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans NaCl à concentrations (1/8M).

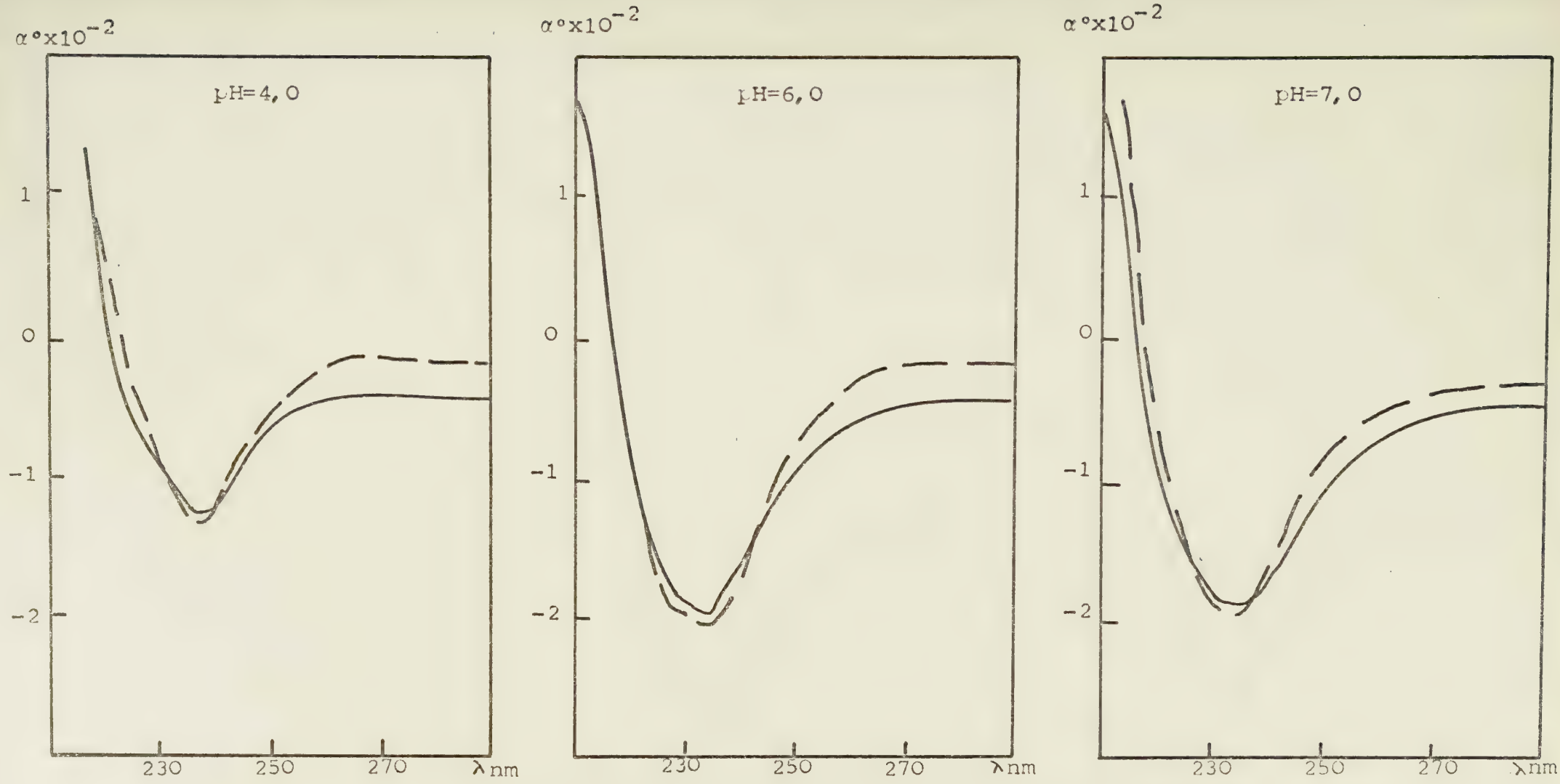


Figure 39 - Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans KCl à (1/8M).

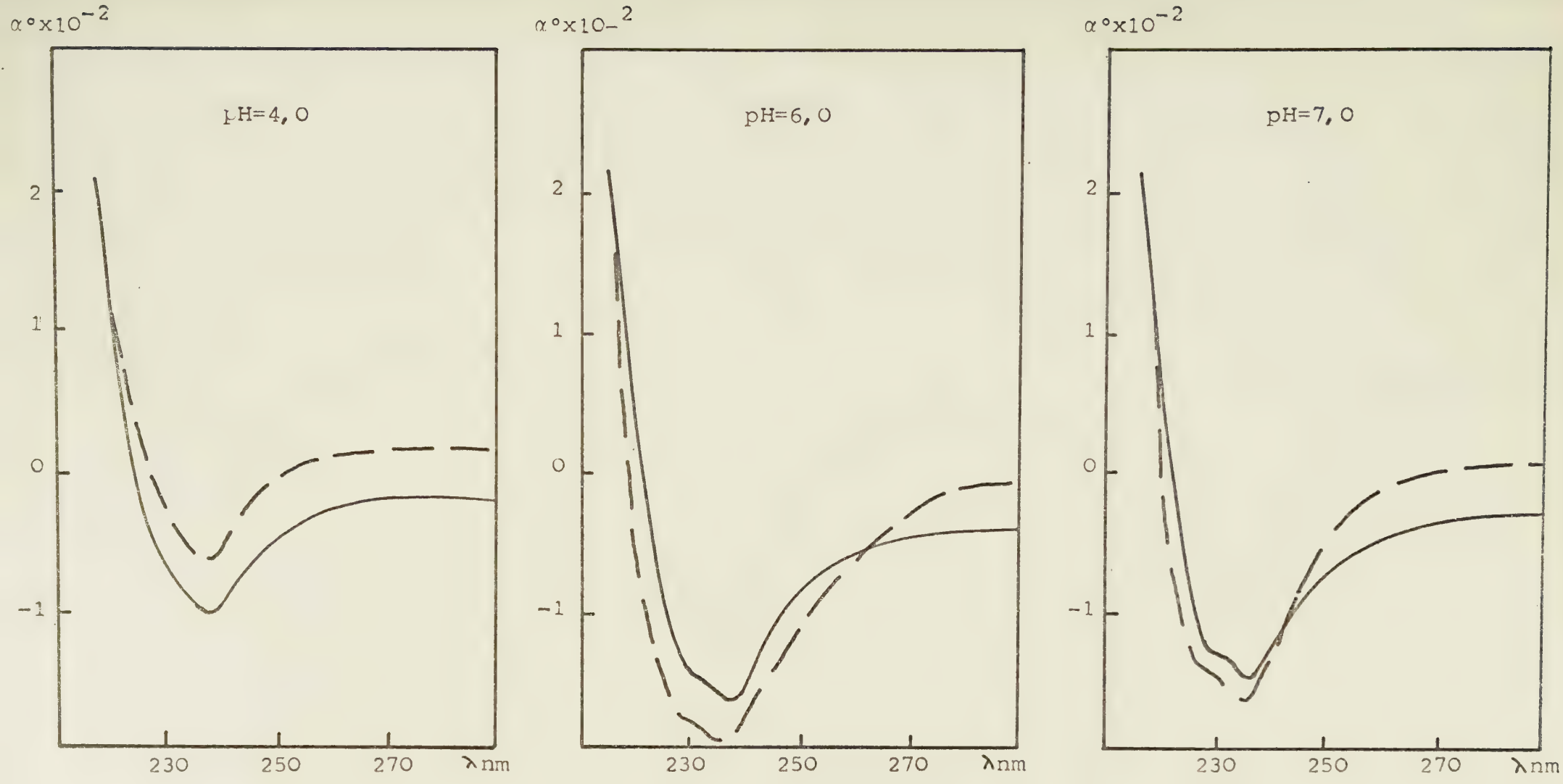


Figure 38 - Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans KCl à (1/16M).

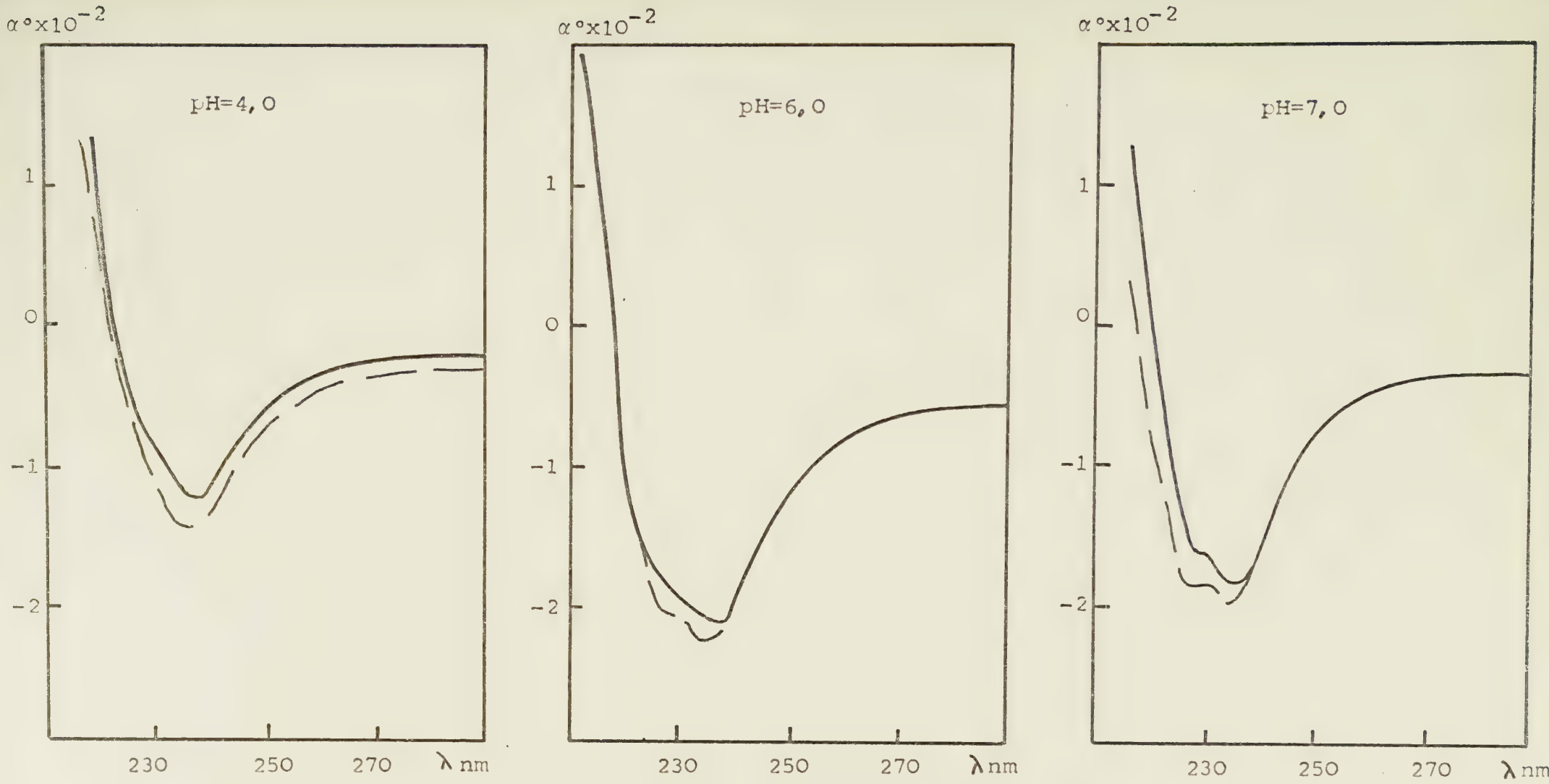


Figure 37- Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans NaCl à (1/4M).

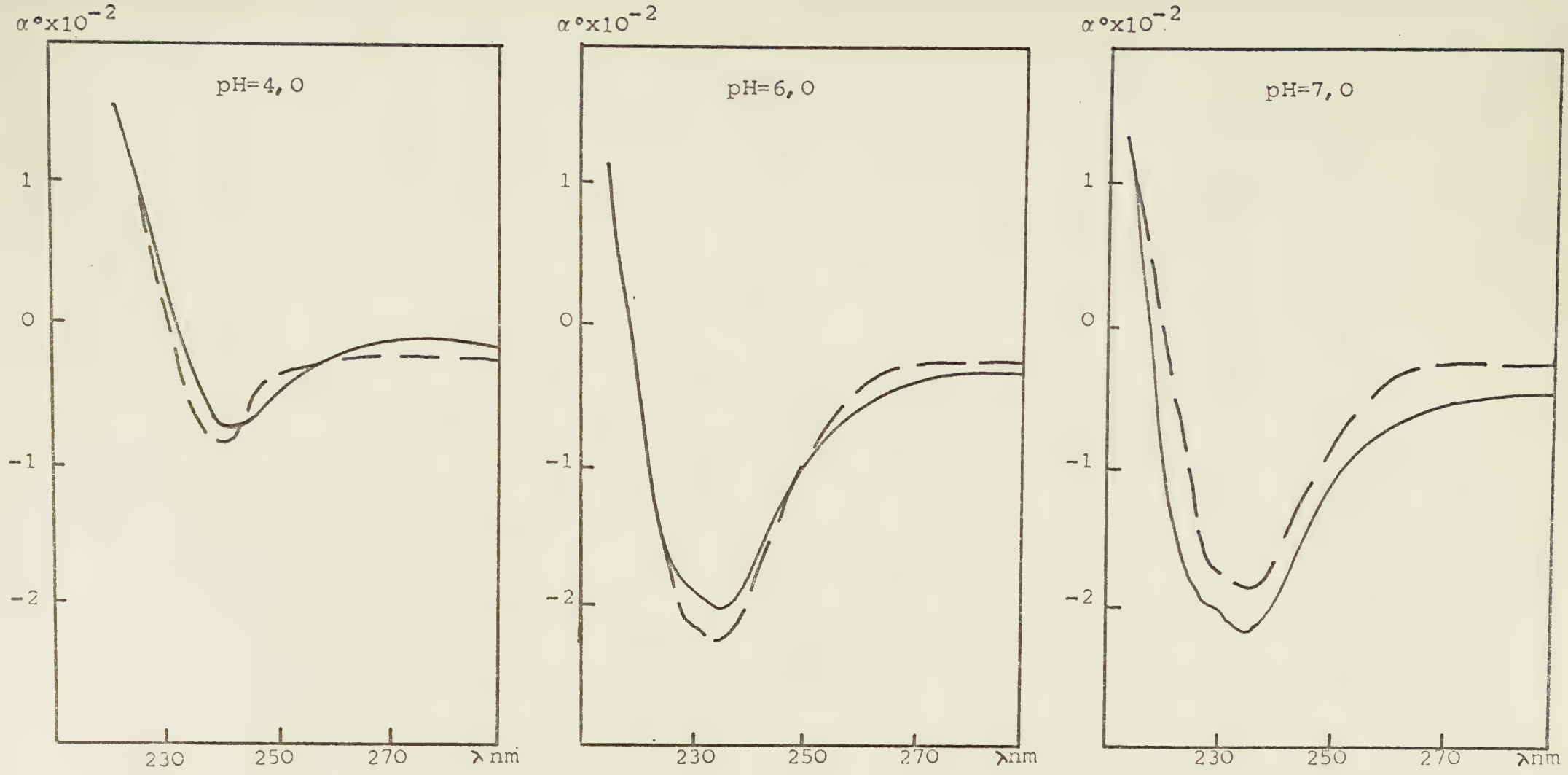


Figure 40 - Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans LiCl à (1/16M).

On remarque également qu'à l'image de ce qui se produit en solution non saline, l'intensité de fluorescence diminue avec la quantité d'acide ascorbique fixée. Fig. 41, 42, 43.

XI- Répercussion de la présence de divers anions sur l'amplitude de la fixation.

A- Les halogénures.

1- Les recherches ont d'abord porté comparativement sur trois halogénures (.) de NaF, NaCl, NaI.

Il existe des points communs concernant leur influence sur le processus de fixation de l'acide ascorbique. Ainsi que le montrent les tableaux XXVI- à XXIX pour NaCl puis XXX et XXXI pour NaF et NaI, la fixation du ligand diminue en fonction de la concentration molaire du sel, et ceci quelque soit le pH considéré.

Pour une concentration molaire saline donnée, la fixation augmente lorsque le pH croît de 4,0 à 6,0 puis commence à décroître.

Par contre les concentrations qui empêchent toute fixation sur la protéine varient en fonction de la nature de l'anion. Elles sont respectivement voisines de $\frac{M}{4}$, $\frac{M}{2}$ et $\frac{M}{2}$ pour F^-, Cl^- et I^-.

Si l'on opère en présence d'une même concentration du ligand, on note que dans la limite où une fixation est encore mesurable, et pour une même concentration saline, l'indice de fixation de l'acide ascorbique décroît dans l'ordre = $I^- > Cl^- > F^-$ (fig. 44 et 45).

2 - Etude spectropolarimétrique.

Elle n'a été réalisée que dans le cas de

(.) Les halogènes appartiennent au groupe 7 de la classification périodique.

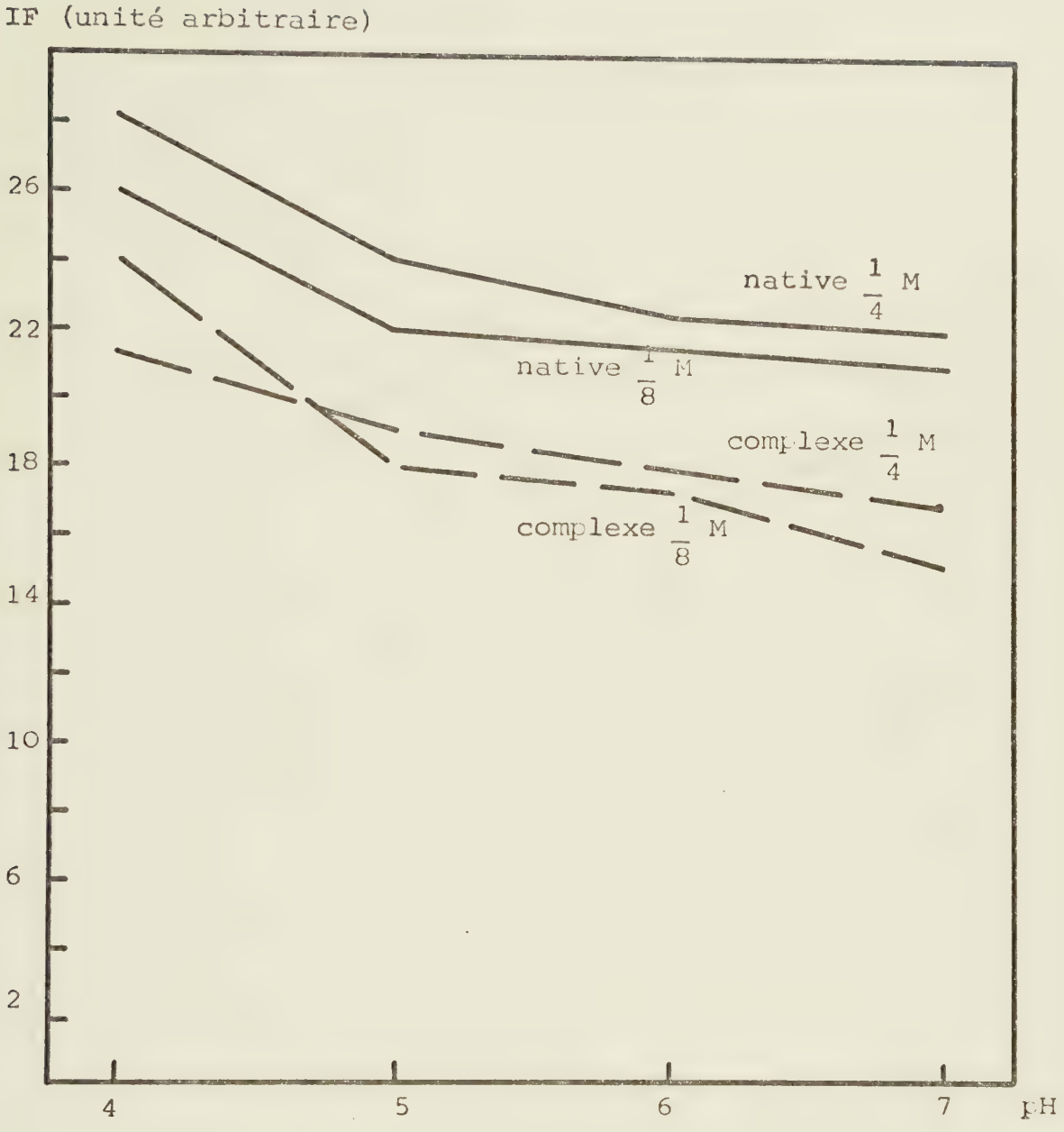


Figure 41 - Variations comparées en fonction de la concentration en NaCl et du pH, du maximum d'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après la fixation de l'acide ascorbique.

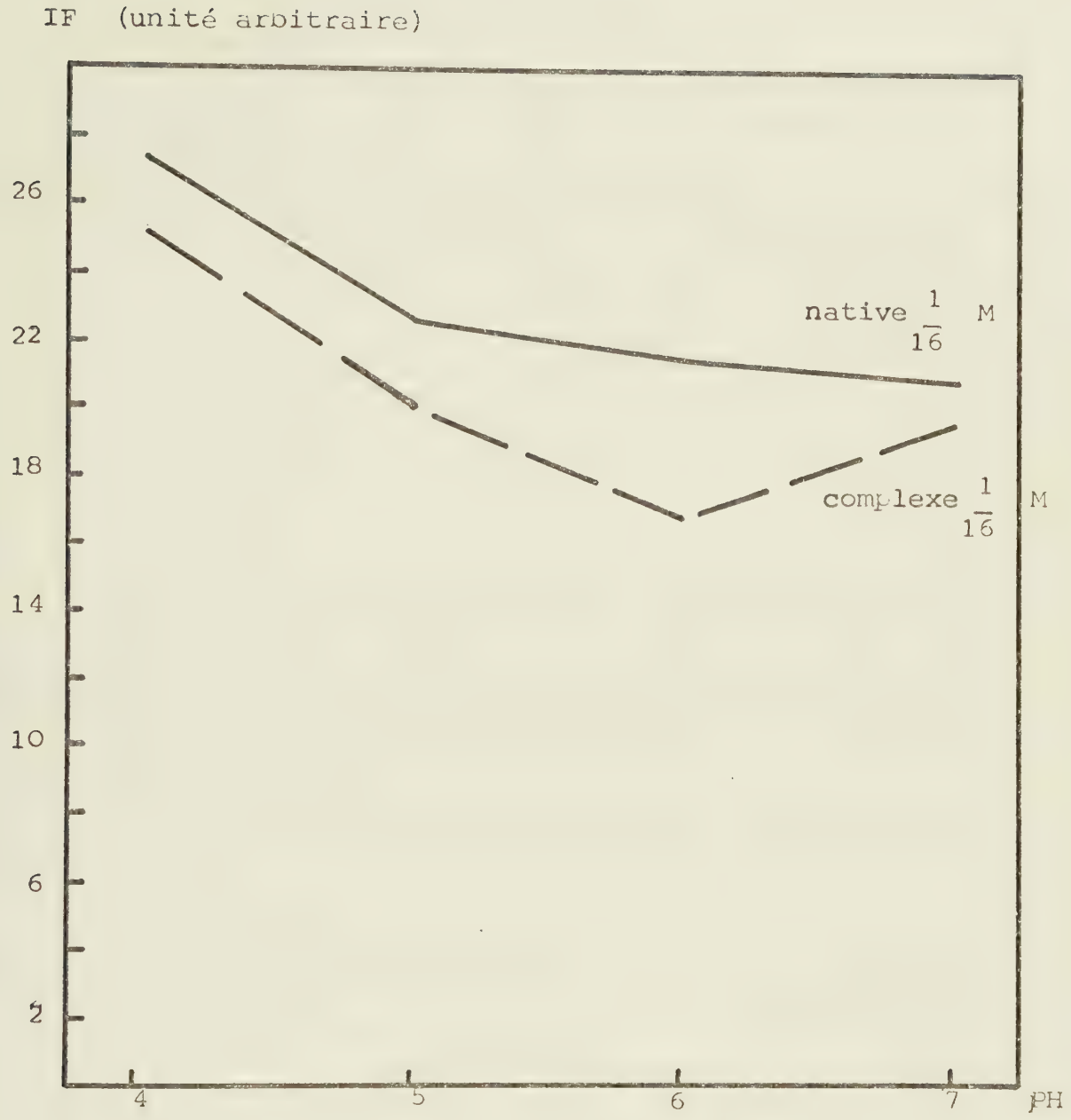


Figure 41 - b- Variations comparées en fonction de la concentration en NaCl et du pH, du maximum de l'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après la fixation de l'acide ascorbique.

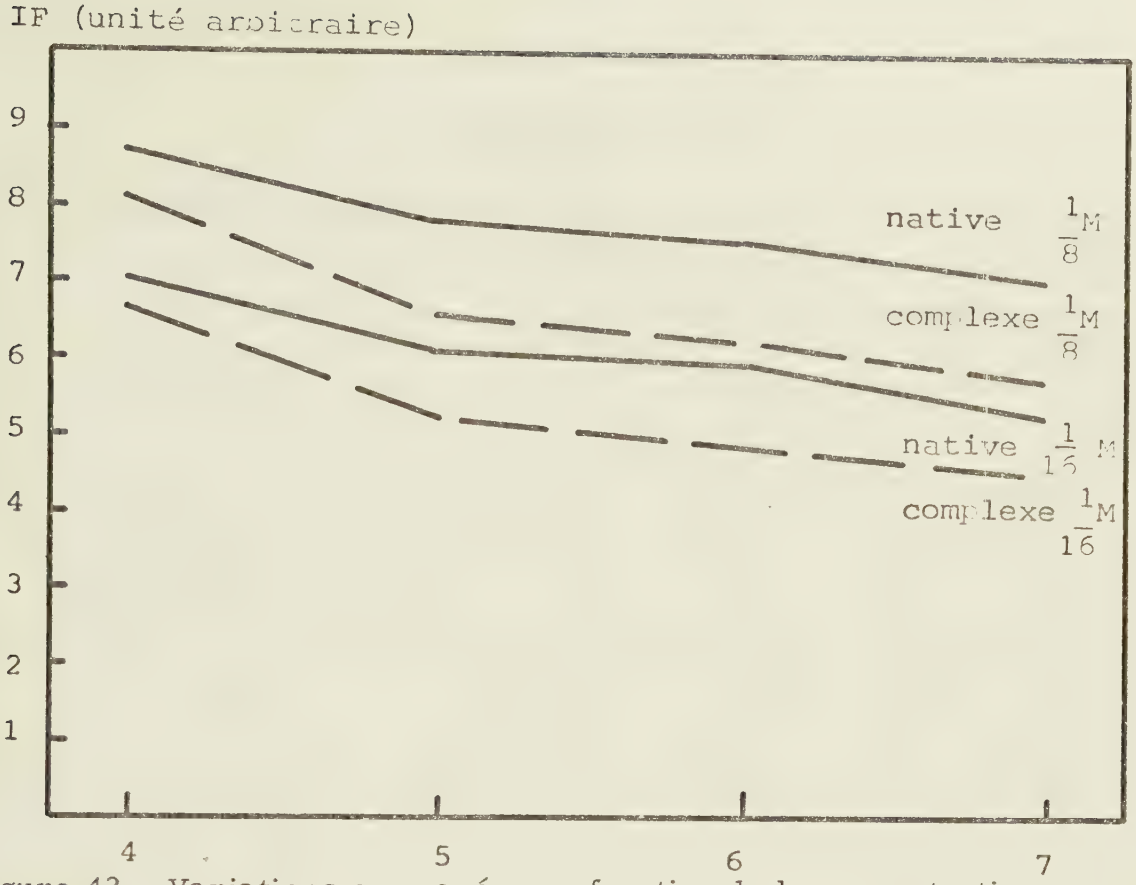


Figure 42 - Variations comparées en fonction de la concentration en KCl et du pH, du maximum d'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après la fixation de l'acide ascorbique.

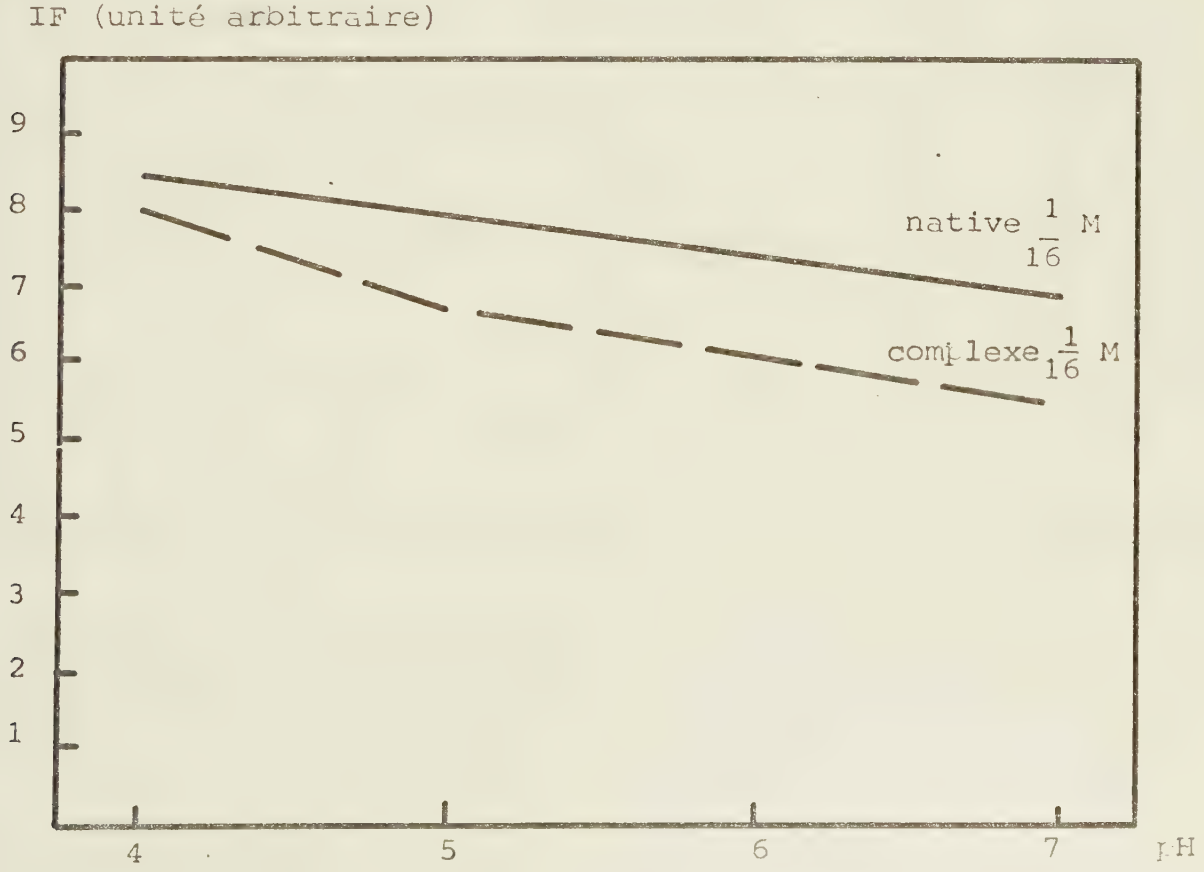


Figure 43 - Variations comparées en fonction de la concentration en LiCl et du pH, du maximum d'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après fixation de l'acide ascorbique.

Tableau XXX-

pH	Expression de la fixation	Concentrations salines en NaF			
		0	1/16M	1/8M	1/4M
4,0	IFP	20	1,6	1,2	0
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	43,16	3,46	2,59	0
5,0	IFP	16	3,2	2,6	0
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	32,72	6,55	5,3	0
6,0	IFP	24	4	3,5	0
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	55,9	9,3	7,9	0
7,0	IFP	21,6	1,2	0,8	0
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	27	1,5	1	0

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en NaF et du pH. Température 20°C. Concentration en β-lactoglobuline 0,5 g/l. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M.

Tableau XXXI-

pH	Expression de la fixation	Concentrations salines en NaI			
		0	1/16 M	1/8 M	1/4 M
, 0	IFP	20	12	8	4
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	43, 16	25, 9	17, 26	8, 63
, 0	IFP	16	14	12	7, 6
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	32, 72	29	24, 5	15, 5
, 0	IFP	24	20	14	8
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	55, 9	46, 6	32, 6	18, 6
, 0	IFP	21, 6	10, 4	6, 4	2
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	27	13	8	2, 5

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en NaI et du pH (étude réalisée à la température de 20°C Concentration en β-lactoglobuline 0, 5 g/l ; acide ascorbique 2, 5 x 10^{-3} M.)

Figure 44 - Variation de l'IFP de la vitamine C sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en NaF et du pH. Température +20°C. acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M. β-lactoglobuline 0,5 g/l.

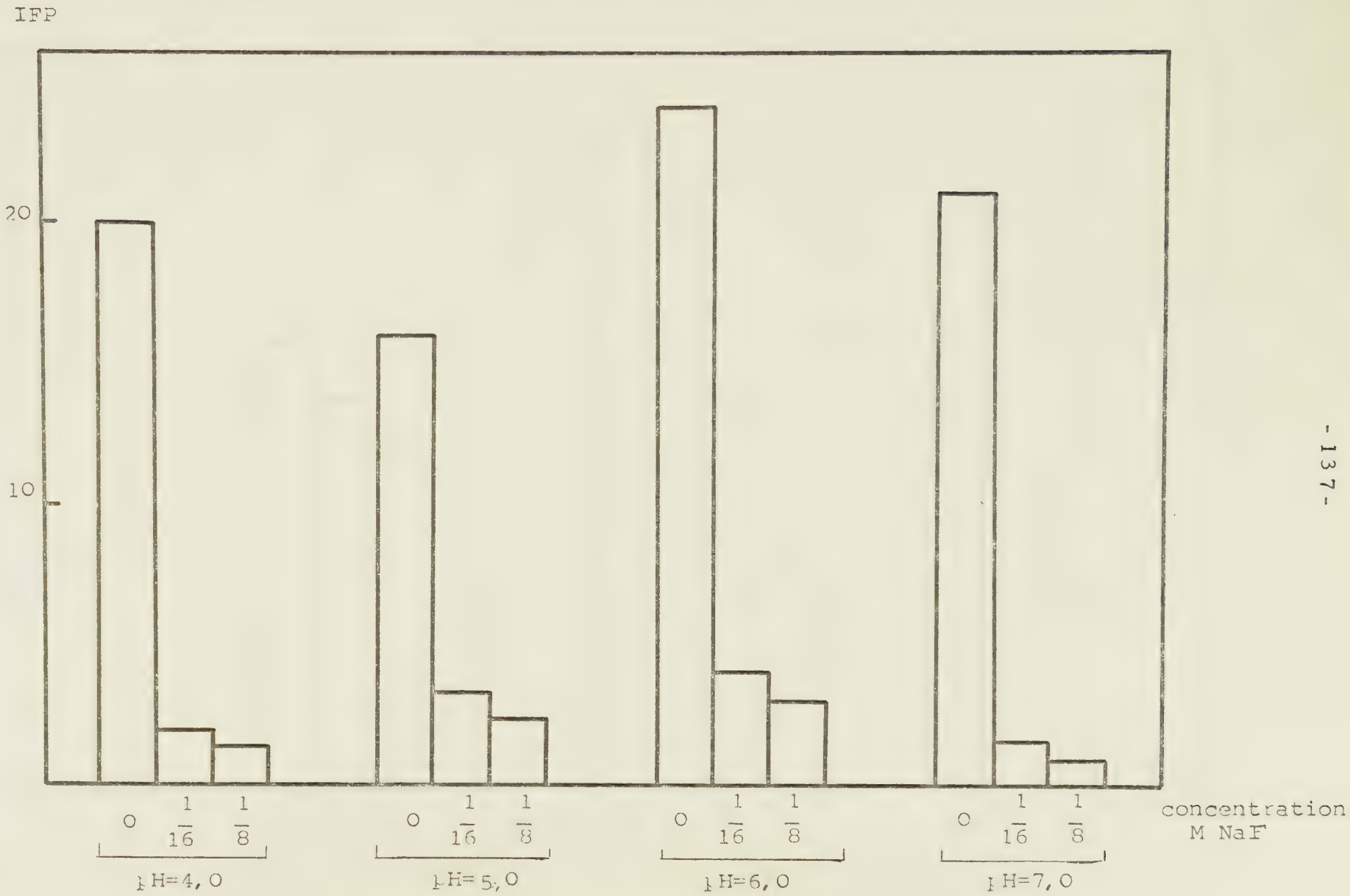
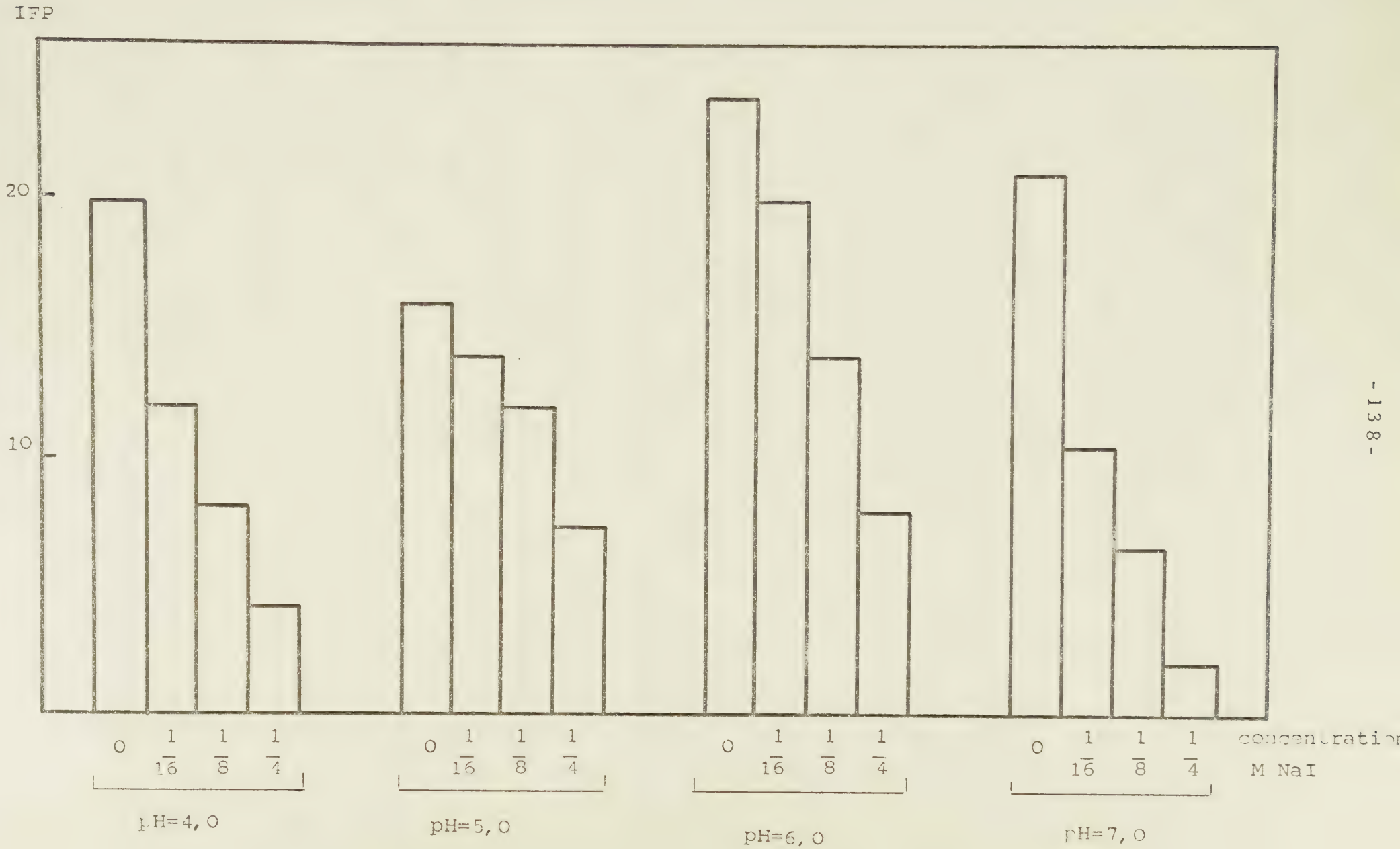


Figure 45 - Variation de l'IFP de la vitamine C sur la β-lactoglobuline en fonction du pH et de la concentration en NaI. Température +20°C.



NaF et NaCl parce que l'absorption de NaI dans la zone de l'effet Cotton rendait impossible la réalisation pratique des mesures. Les figures 46 et 47 montrent que la fixation entraîne une diminution de l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton à pH = 4,0 et une augmentation à pH = 6,0 et 7,0.

Qualitativement, F^- et Cl^- réagissent d la même manière. La comparaison des amplitudes néga tives des spectres et l'interprétation des différences observées est très délicate car les quantités de ligand fixées influent elles-mêmes sur ces amplitudes. Or, o l'a vu, l'indice de fixation varie en fonction de la natu re de l' halogénure en cause.

3- Etude spectrofluorimétrique.

En choisissant comme références les so lutions de β-lactoglobuline en présence des mêmes con centrations salines, on constate que l'intensité de fluo rescence du complexe ascorbique est toujours plus fai- ble quelque soit le pH de la solution et l'halogénure en cause (fig. 48-49). En milieu salin, et selon la règle générale établie, la fixation du ligand augmente donc l masquage du tryptophane.

B- Les anions composés (oxygénés).

Après les anions des halogénures de Na ce sont les anions composés

NO_3^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-}, $P_2O_7^{4-}$, et $P_3O_{10}^{5-}$ qui ont fai

l'objet de recherches. Ain de pouvoir être étudiés com- parativement, tous sont liés au cation Na^+ comme dans le cas des halogénures.

Ils ont été placés dans le milieu du for- mation précédemment défini des complexes ascorbiques aux concentrations N/16, N/8 et N/4.

La concentration en β-lactoglobuline es uniformément 0,5 g/l. Le pH a été ajusté par addition ménagée et sous agitation de petites quantités de NaOH diluée ou de l'acide correspondant à l'anion en cause.

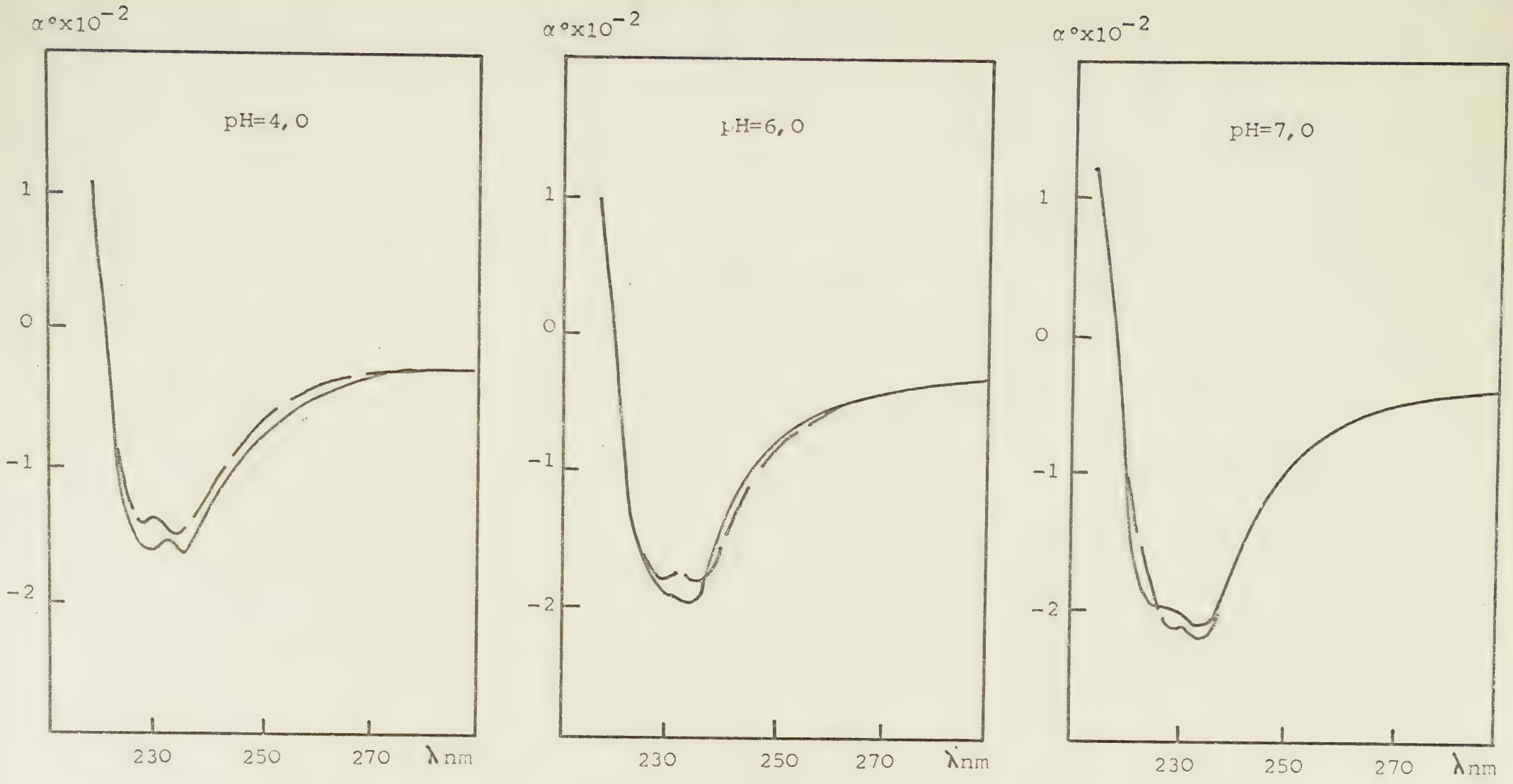


Figure 46 - Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans NaF à -1/16M).

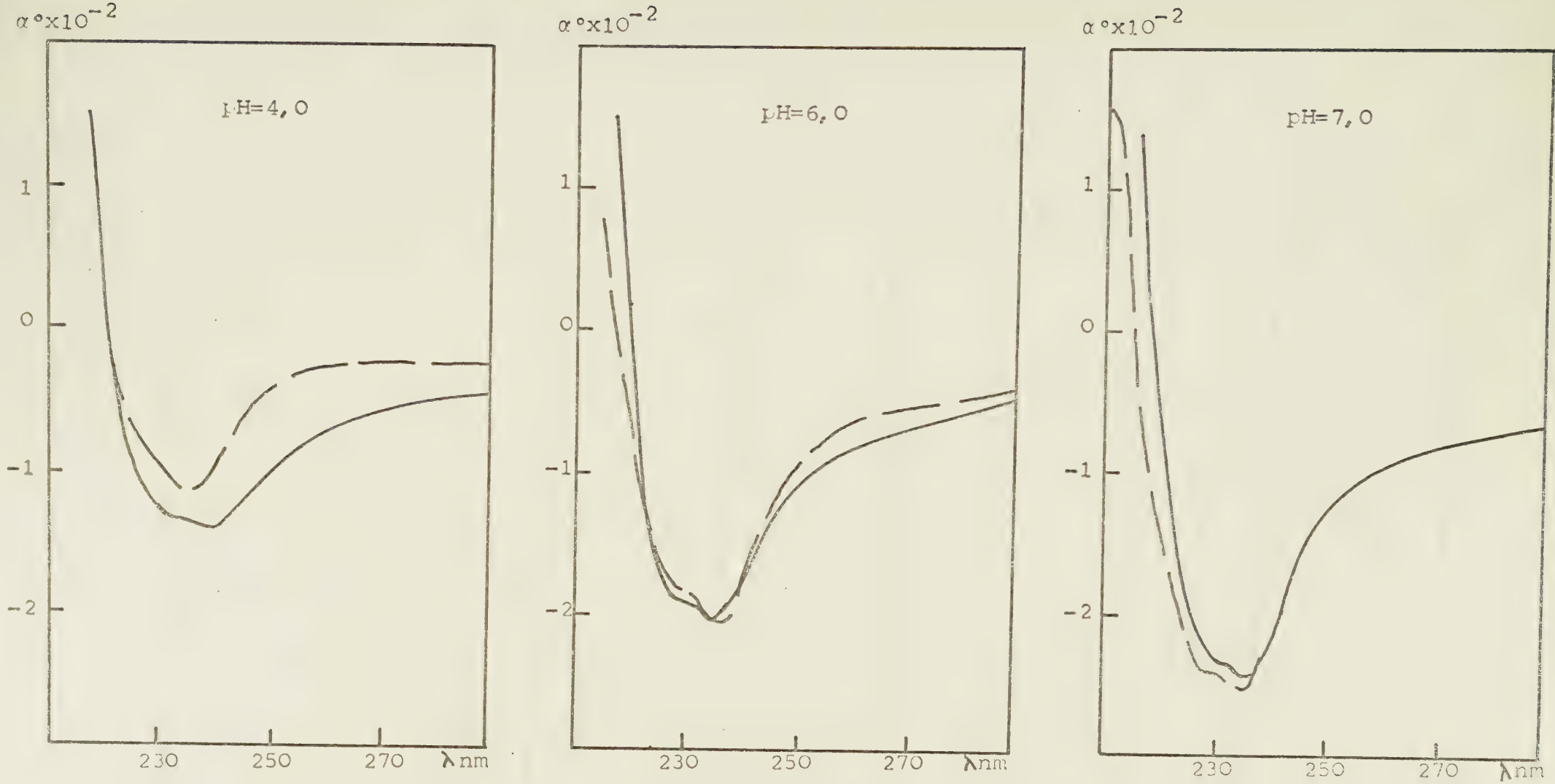
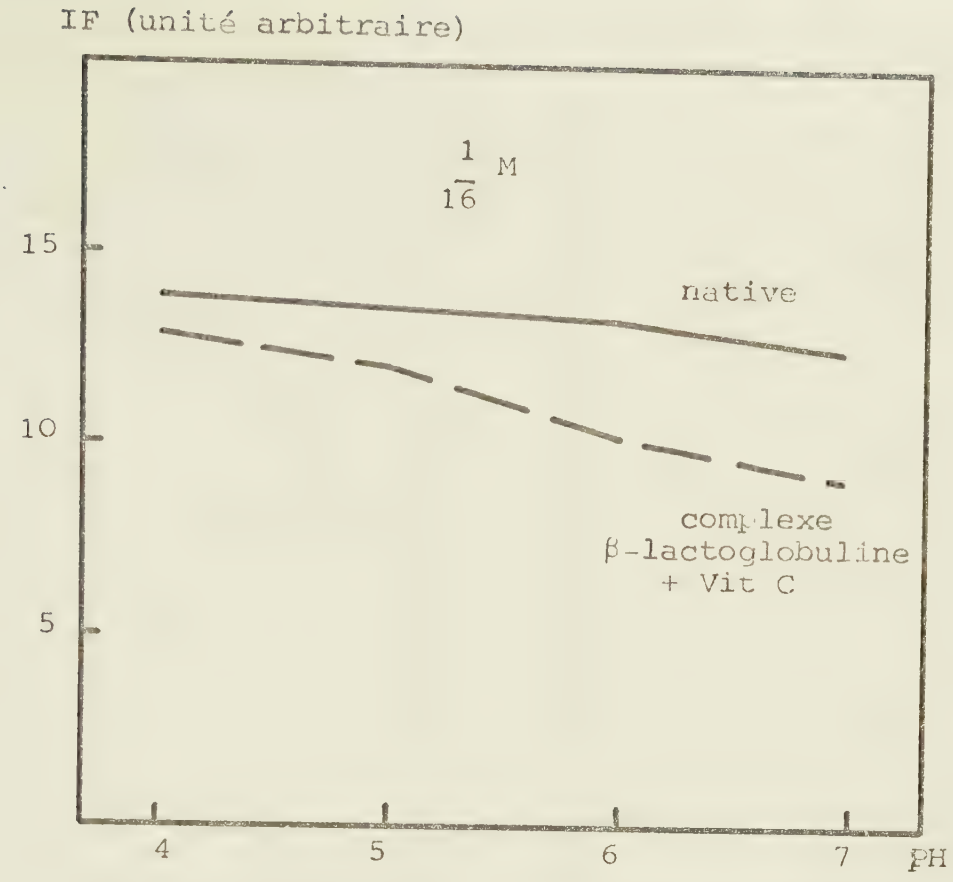


Figure 47 - Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans NaF à (1/8M).



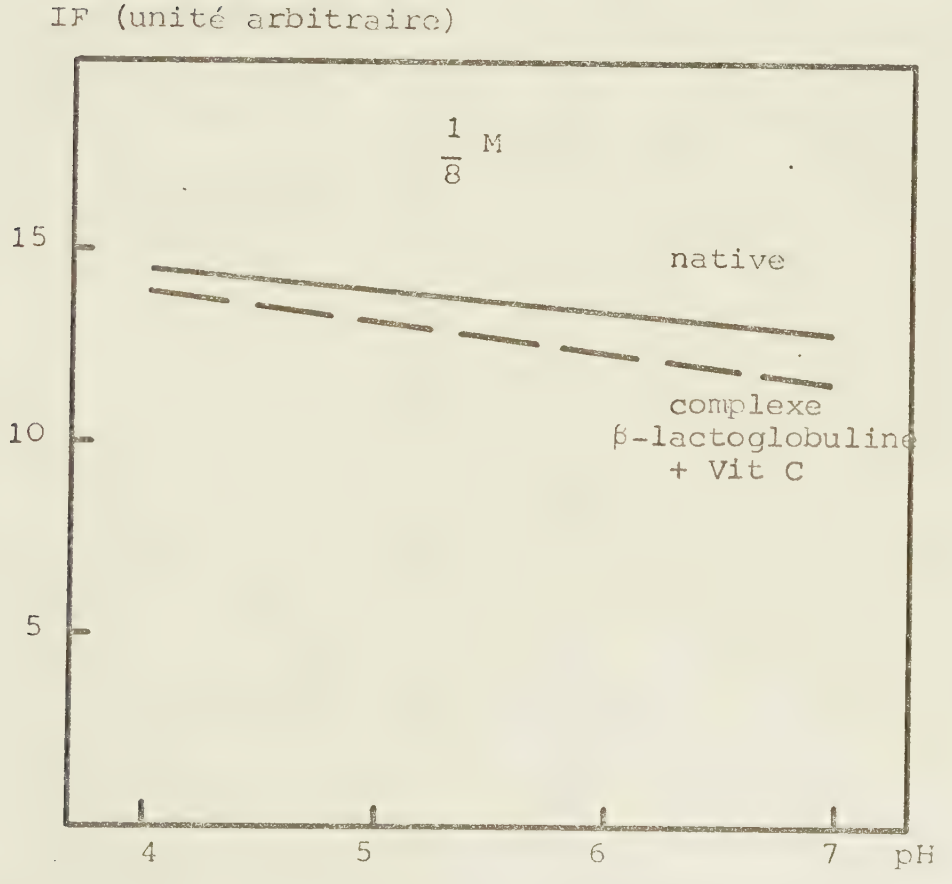
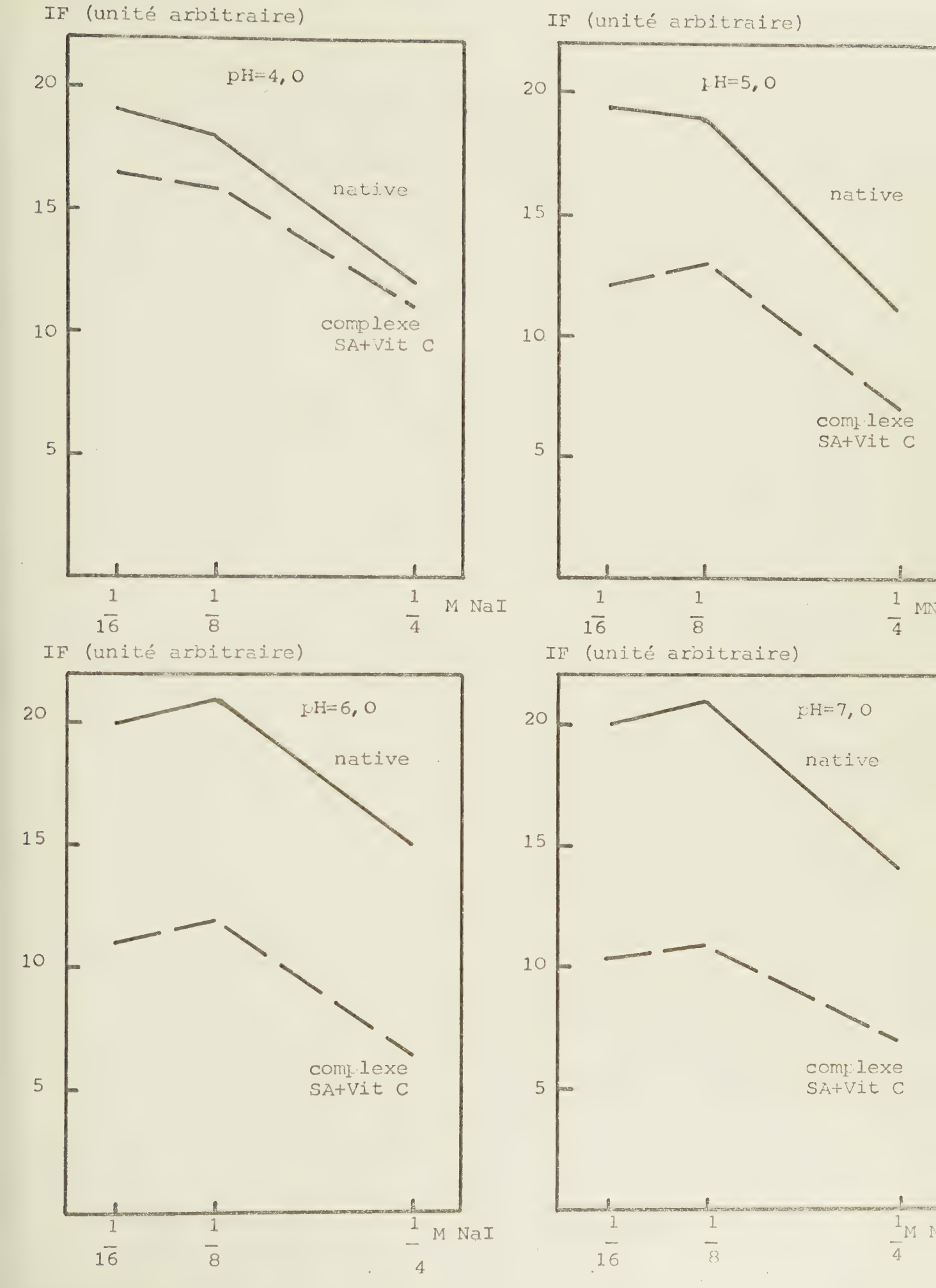


Figure 48 - Variations comparées en fonction de la concentration en NaF et du pH du maximum de l'intensité de florescence de la β -lactoglobuline avant après la fixation de l'acide ascorbique.

Figure 49- Légende p. 144-



Légende de la figure 49 -

Variations comparées en fonction de la concentration en NaI et du pH du maximum de l'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après la fixation de l'acide ascorbique.

Cependant étant donné l'impossibilité de pouvoir disposer des acides pyro - et tripolyphosphorique, l'acidification a été éventuellement réalisée avec de l'acide orthophosphorique.

I- Action du Nitrate.

—a- Importance de la fixation.

Le tableau XXXII et la fig. 50, montrent que :

- Pour une même valeur du pH et à l'inverse de ce que l'on a constaté en présence d'halogénures, l'importance de la fixation augmente quand s'accroît la concentration saline.

- Pour une même concentration saline, l'importance de la fixation diminue quand le pH augmente.

—b- Etude spectropolarimétrique.

Elle n'a pu être réalisée car la forte absorption des nitrates dans l'UV ne permet pas d'effectuer des mesures dans la zone de l'effet Cotton.

—c- Etude spectrofluorimétrique.

On retrouve en présence de Nitrate (fig. 51) des variations du même ordre que celles observées dans le cas des halogénures.

Par rapport à la fluorescence du témoin protéique placé dans les mêmes conditions de pH et de salinité, celle du complexe ascorbique diminue quelque soit le pH.

II- Sulfate de sodium.

—a- Importance de la fixation.

Les résultats sont exposés tableau XXXIII et fig. 52. Nous retrouvons donc ici des conditions de fixation comparables à celles qui se présentent lorsque

Tableau XXXII

pH	Expression de la fixation	Concentrations en $NaNo_3$		
		1/16N	1/8N	1/4N
4, 0	IFP	49	54	56
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	106	116, 6	121
5, 0	IFP	42	46	48, 2
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	86	94	98
6, 0	IFP	20, 8	25, 6	28
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	48, 4	59, 6	65
7, 0	IFP	7	16	19
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	8, 75	20	23, 8

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la -lactoglobuline en fonction de la concentration en nitrate de sodium et du pH. (β-lactoglobuline à 0,5 g/l ; Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M ; Température +20°C).

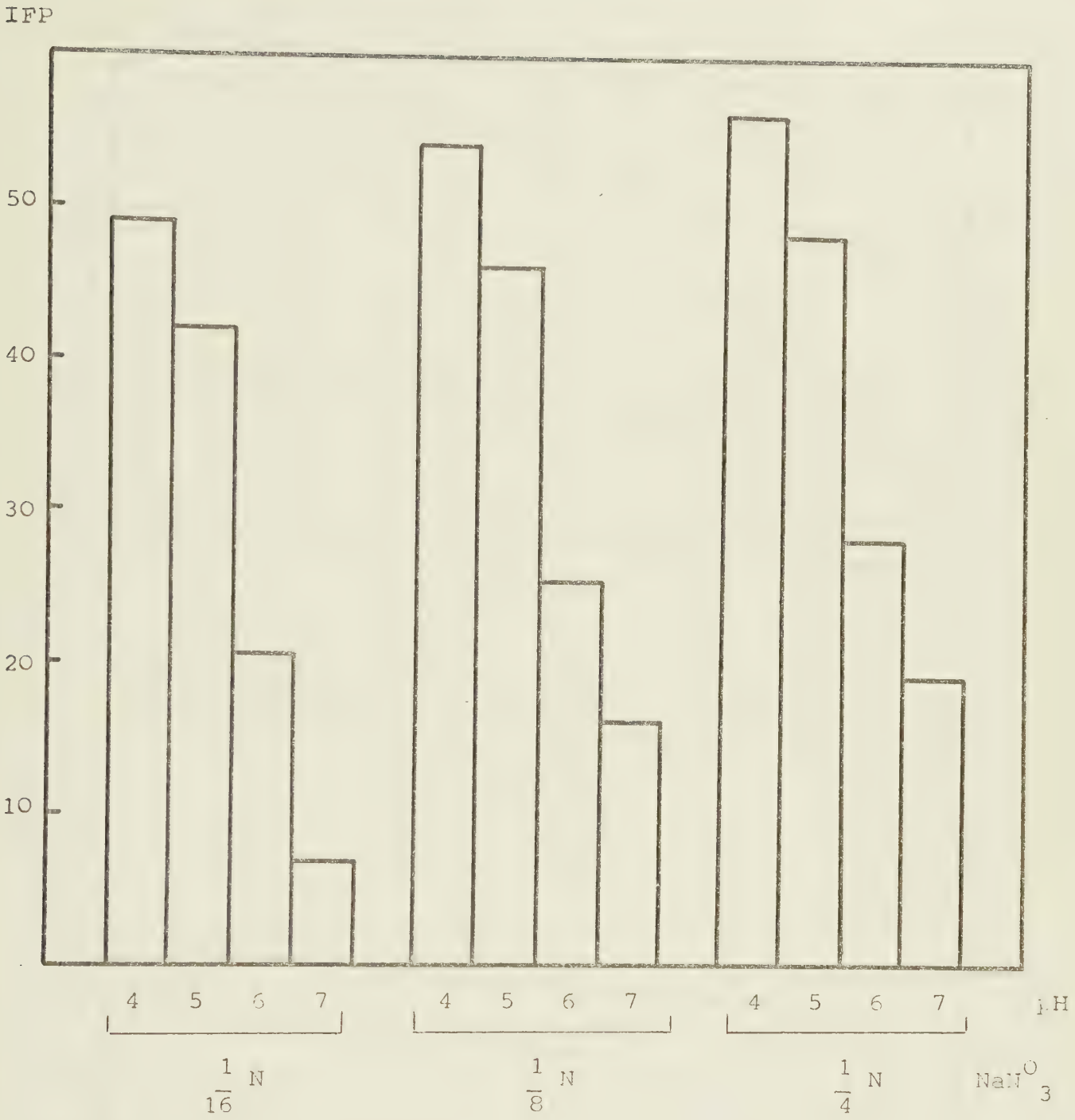
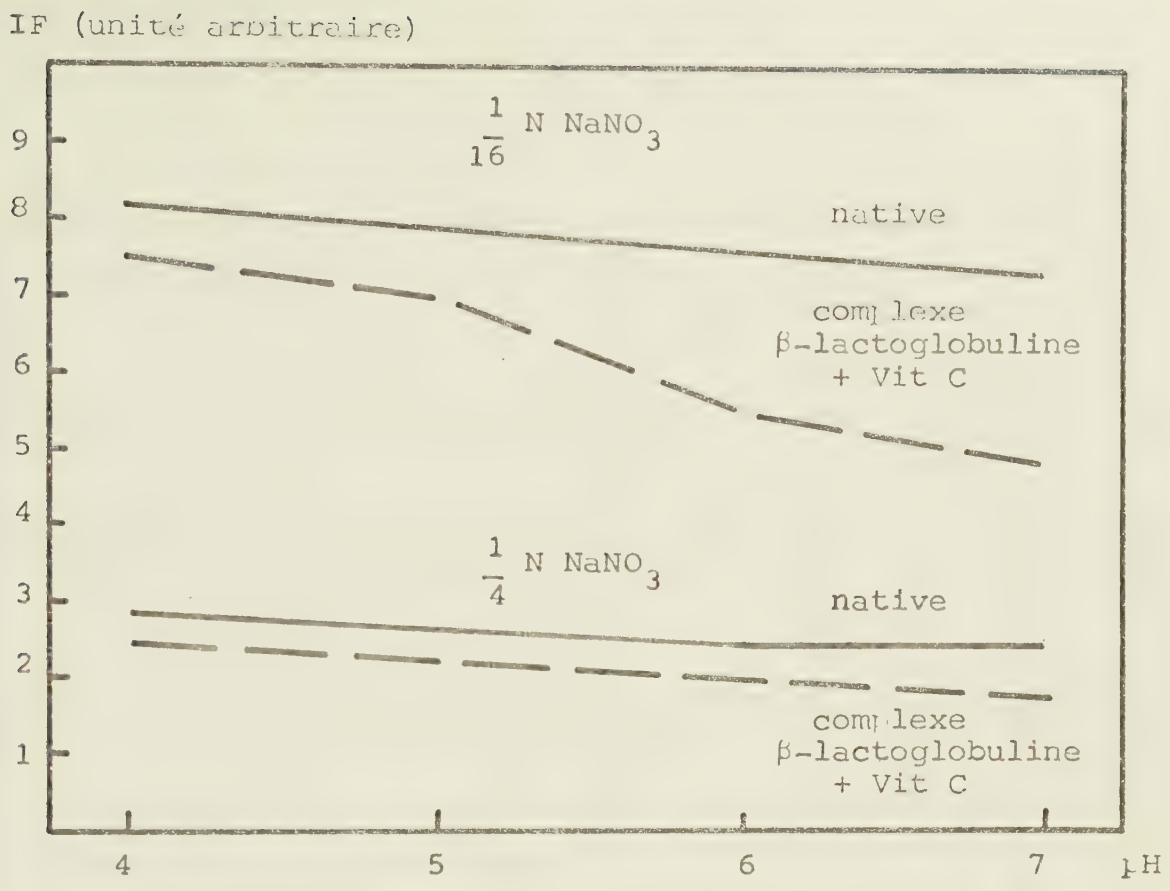


Figure 50 - Variation de l'IFP de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en nitrate de sodium et du pH. β-lactoglobuline à 0,5 g/l. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M. Température +20°C.



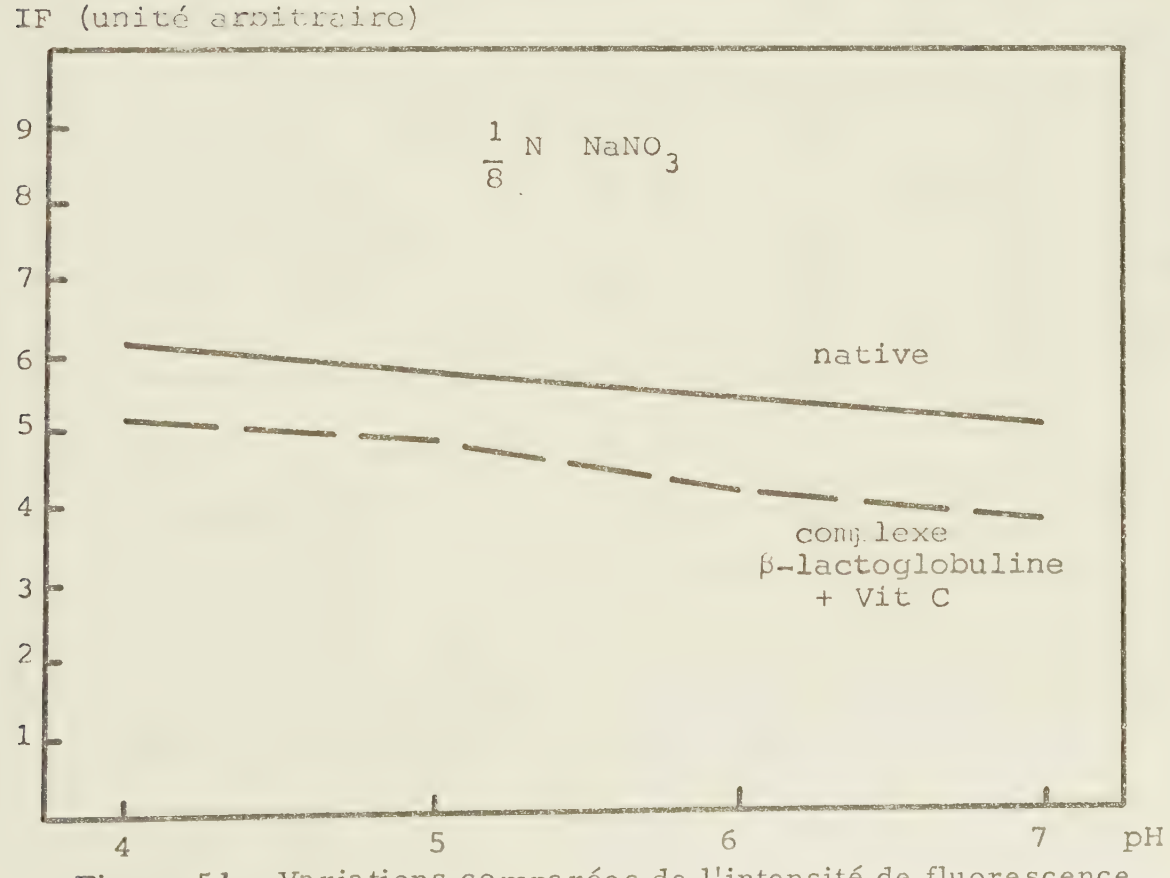


Figure 51 - Variations comparées de l'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après la fixation de l'acide ascorbique en fonction de la concentration en nitrate de sodium et du pH.

Tableau XXXIII-

pH	Expression de la fixation	Concentrations en Na_2SO_4		
		1/16N	1/8N	1/4N
4,0	IFP	52	62	68
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	112	134	147
5,0	IFP	40	46	56
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	82	94	114,5
6,0	IFP	24	30,4	44
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	56	70,8	102,4
7,0	IFP	12	19	24
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	15	23,8	30

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline, en fonction de la concentration en sulfate sodique et du pH. (β-lactoglobuline à 0,5 g/l ; acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M ; température +20°C.)

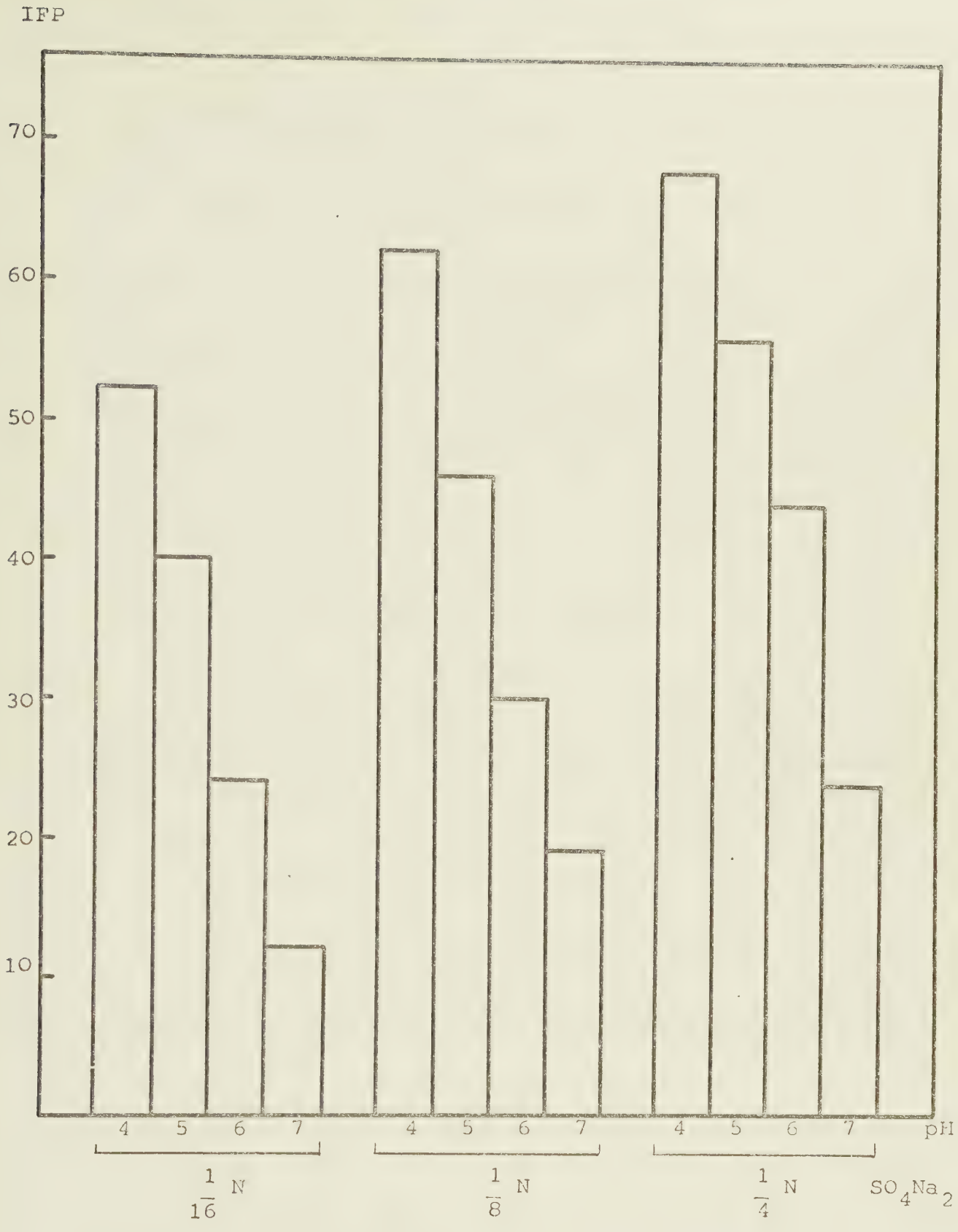


Figure 52 - Variations de l'IFP de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en sulfate sodique et du pH.
β-lactoglobuline à 0,5 g/l. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M.

l'on opère dans un milieu renfermant du nitrate de sodium (cf. tableau XXXII).

— b- Etude spectropolarimétrique.

L'expérimentation réalisée en présence de NaCl avait montré que l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton augmentait d'une façon générale avec l'importance de la fixation, c'est-à-dire de la concentration saline du mélange au sein duquel se forme le complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique. Une certaine irrégularité de l'augmentation de l'amplitude se manifestait cependant pour certaines concentrations salines et valeurs du pH. Si l'on remplace Cl^- par SO_4^{--}, une irrégularité analogue se manifeste pour deux valeurs du pH :

- pH = 4, 0, concentration N/4 au lieu de N/16 dans le cas de Cl^-
- pH = 6, 0, concentration N/8 et N/4 ce qui ne s'observait pas en présence de NaCl.

Les modifications structurales assez irrégulières du complexe ascorbique se manifestent donc toujours semble-t-il en présence de sels (nous les retrouverons encore dans le cas des anions phosphorés) mais leur amplitude et le pH auquel elles apparaissent dépendent de la nature de l'anion et de la concentration du sel de sodium en cause. fig. 53, 54, 55.

— c- Etude spectrofluorimétrique.

La diminution de l'intensité de la fluorescence constatée ici est du même ordre que celle observée lorsque le complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique est formé en présence d'halogénures ou de nitrate de sodium. Fig. 56.

III- Action de l'orthophosphatesodique.

— a- Importance de la fixation.

Elle revêt ici un intérêt tout particulier du fait de l'abondante répartition de PO_4^{3-} dans tous les milieux biologiques.

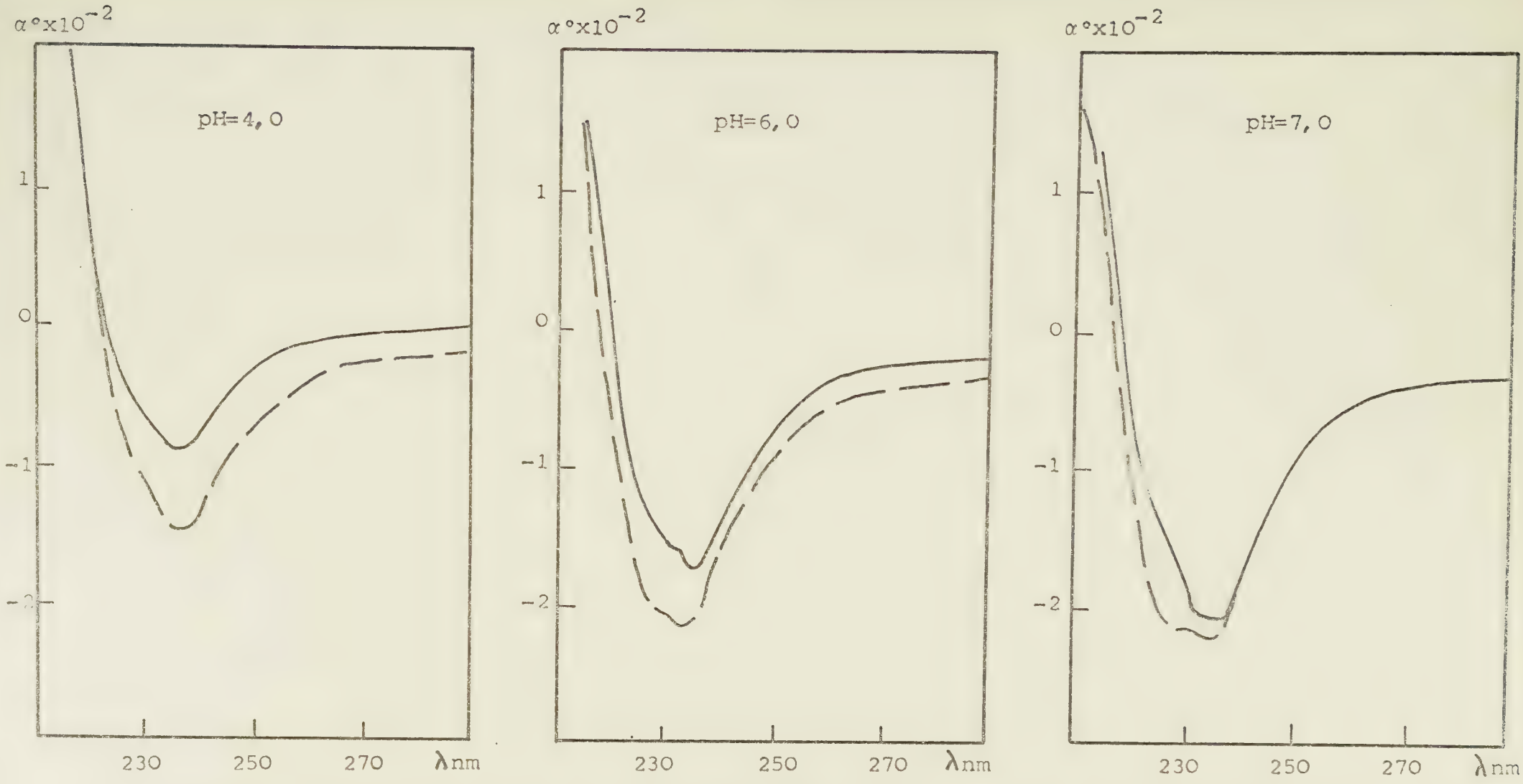


Figure 53 - Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans Na_2SO_4 à (1/16M).

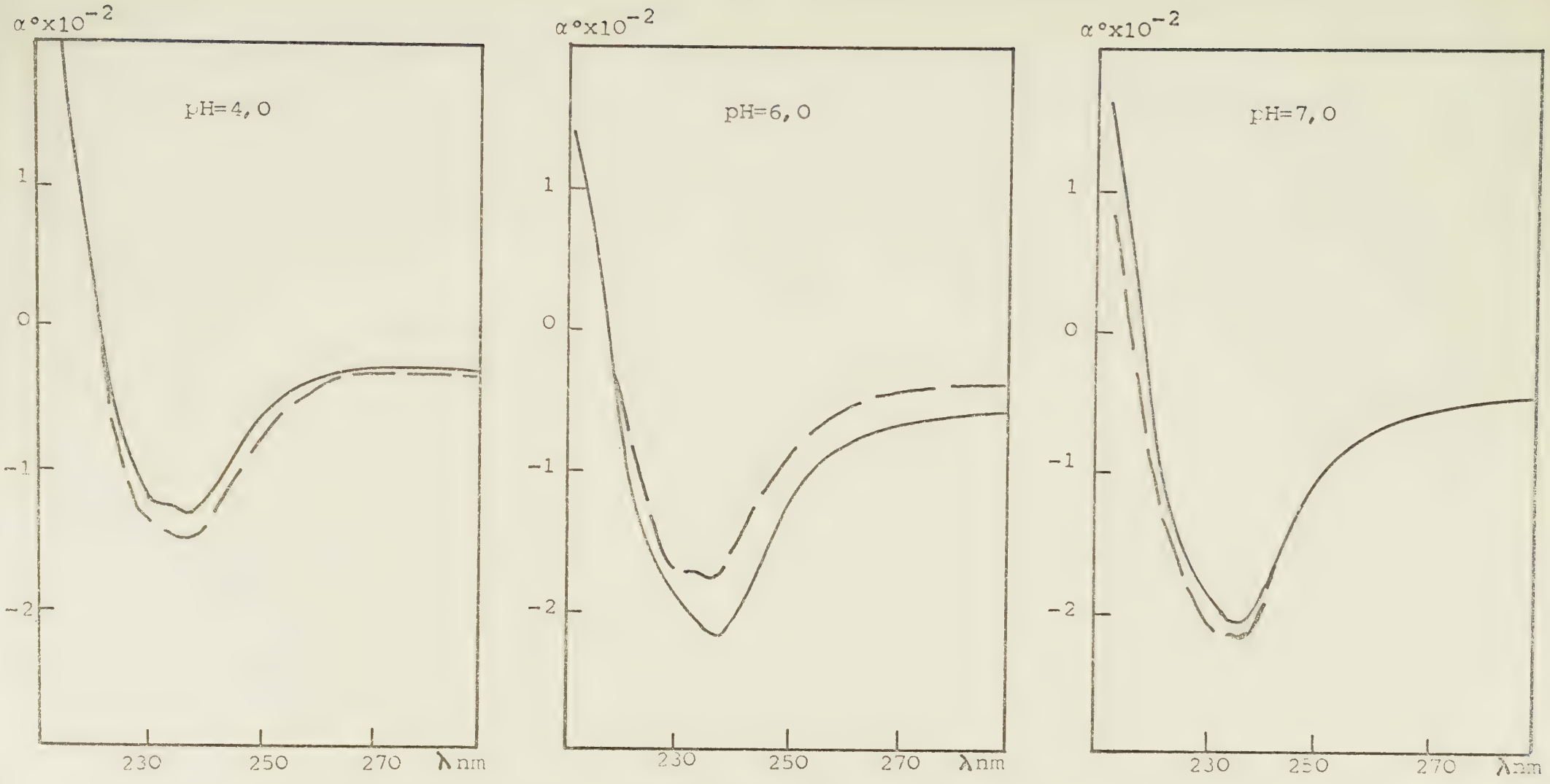


Figure 54 - Comparaisons des restes de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans Na_2SO_4 à (1/4M).

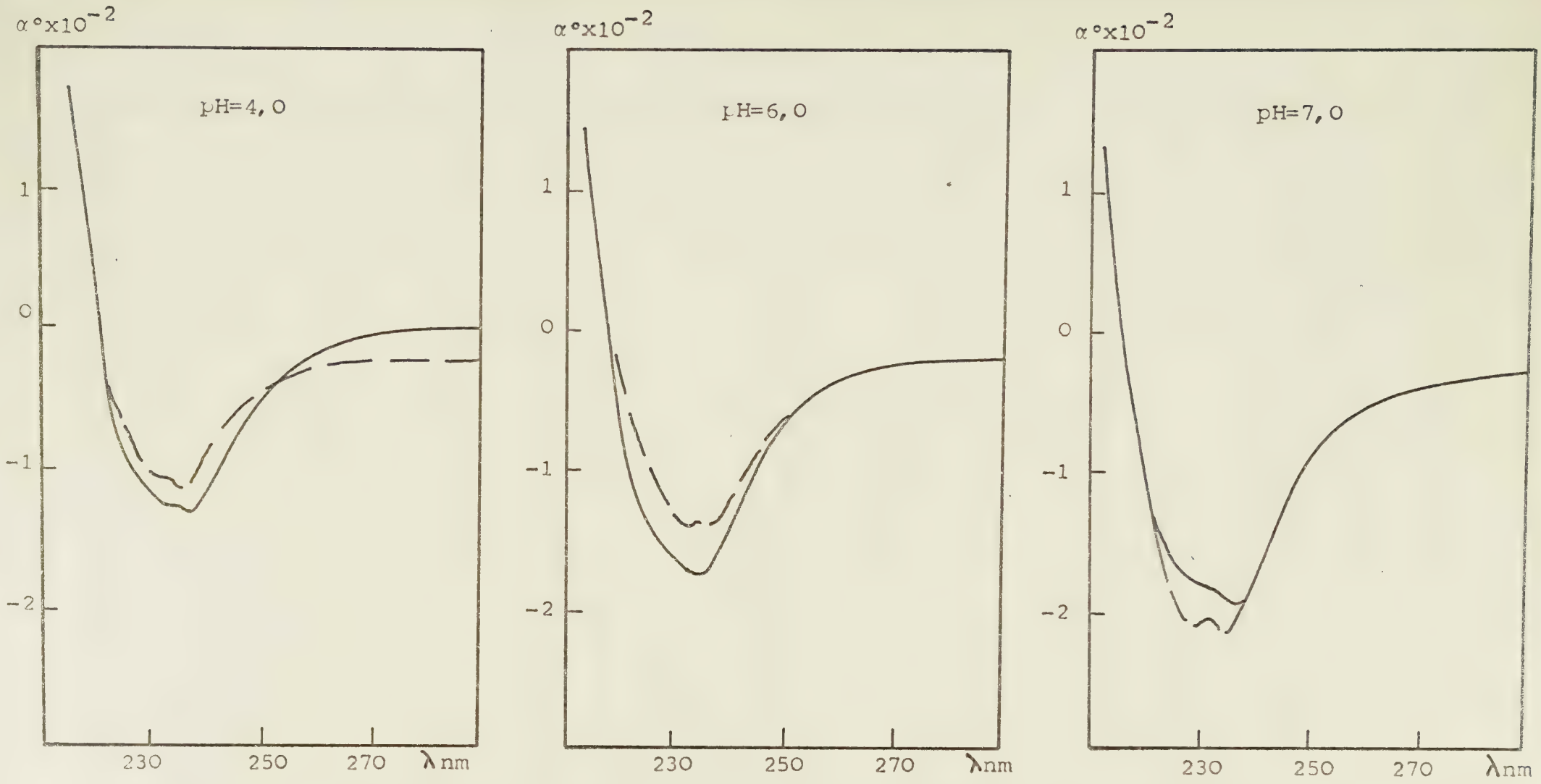
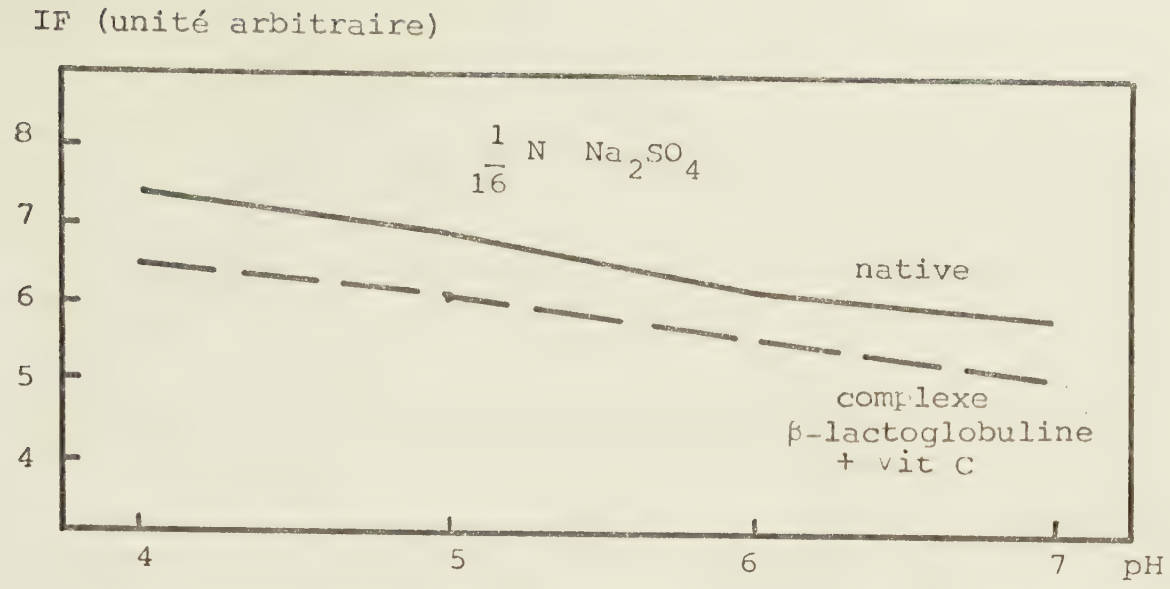


Figure 55 - Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans Na_2SO_4 à (1/4M).



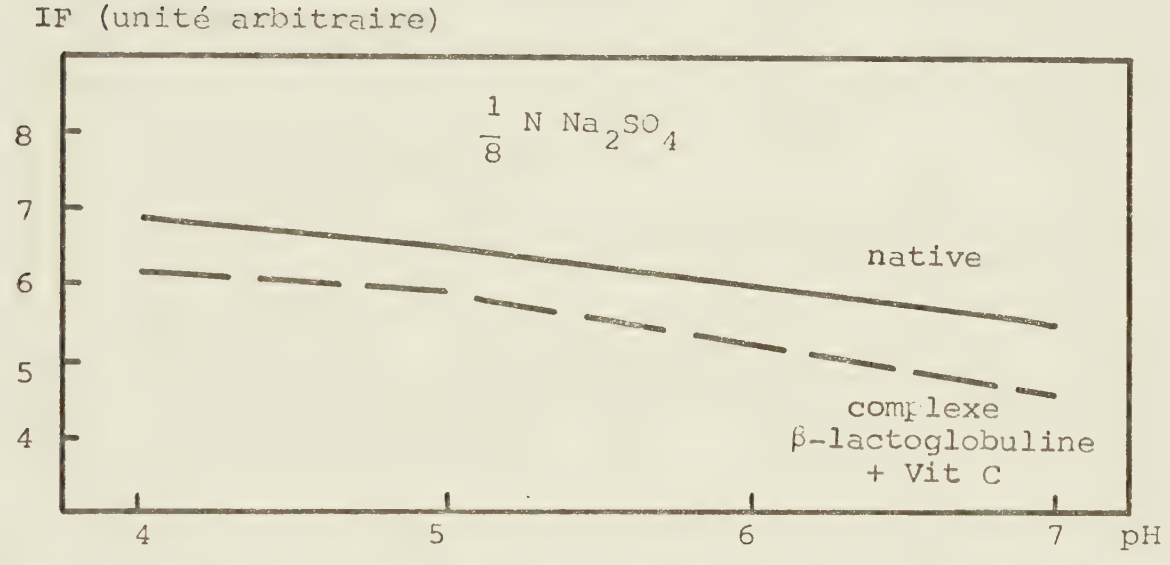
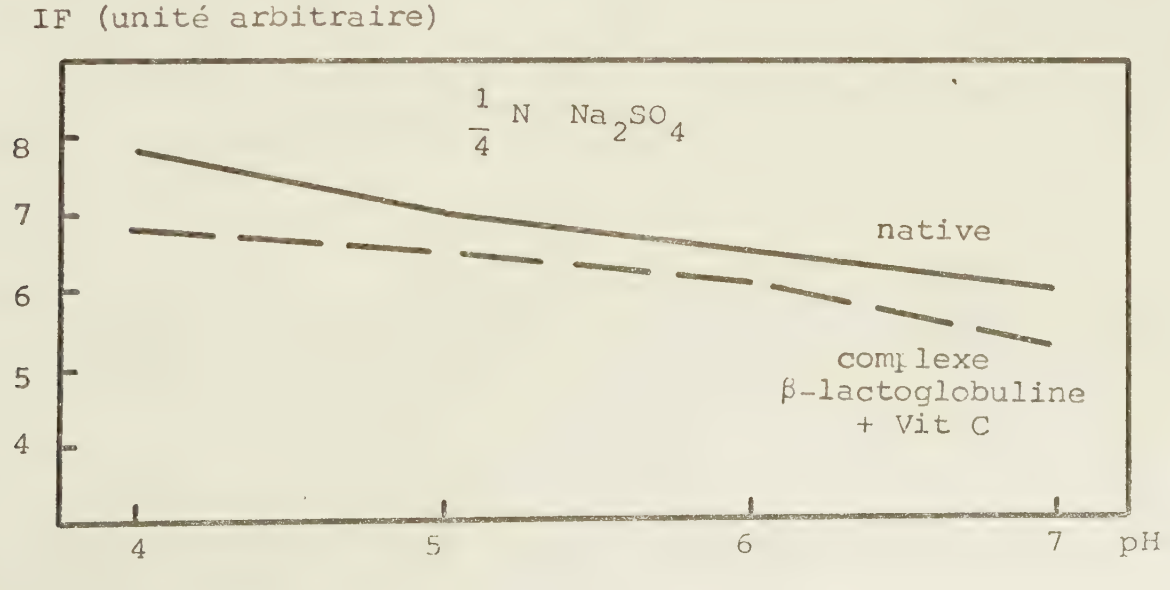


Figure 56 - Variations comparées de l'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après la fixation de l'acide ascorbique en fonction de la concentration en sulfate sodique et du pH.



De l'étude du tableau XXXIV et fig. 57, il ressort que :

- Quelle que soit la valeur du pH et la concentration saline, l'acide ascorbique se fixe toujours sur la β-lactoglobuline.

- Pour une même valeur du pH, l'importance de la fixation croît avec la concentration du sel.

- Pour une concentration saline donnée, l'importance de la fixation décroît quand le pH augmente.

A l'inverse de ce que l'on a constaté en présence des halogénures, une diminution progressive de la fixation se manifeste lorsque le pH augmente à partir du pH = 4,0. Pareil phénomène a déjà été constaté dans le cas de NO_3^- et SO_4^{--} (cf. tableaux 32 et 33).

— b- Etude spectropolarimétrique.

Par rapport à une solution de β-lactoglobuline en milieu phosphaté amené à divers pH et concentrations salines, la structure du complexe se trouve largementmodifiée. C'est ainsi que par rapport au témoin, l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton diminue à pH = 4,0, en présence de PO_4^{---} N/16 et N/4, alors qu'elle augmente si la concentration saline est N/

A pH = 6,0 et 7,0, l'amplitude s'accroît pour les concentrations N/16 et N/8, tandis qu'elle décroît pour N/4. De telles "irrégularités" comparables à celles signalées à propos de SO_4^{--} se retrouvent ici mais les modifications structurales correspondantes paraissent s'amplifier puisqu'il arrive de ne plus constater pour le complexe une structuration moins organisée que celle de la β-lactoglobuline placée dans les mêmes conditions de pH et de salinité. Fig. 58, 59, 60.

— c- Etude spectrofluorimétrique.

Obéissant à ce qui paraît bien être une loi générale, le complexe β-lactoglobuline - acide ascorbique élaboré en présence de PO_4^{---}, présente une

Tableau XXXIV

pH	Expression de la fixation	Concentrations en ortho-phosphate sodique		
		1/16N	1/8N	1/4N
4,0	IFP	42	48	60
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	90,7	103,6	129,5
5,0	IFP	32	42	48
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	65,44	86	98
6,0	IFP	24	32	36
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	56	74,5	84
7,0	IFP	12	16	28
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	15	20	35

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en ortho-phosphate sodique et du pH . (β- lactoglobuline à 0,5 g/l ; acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M ; Température +20°C.)

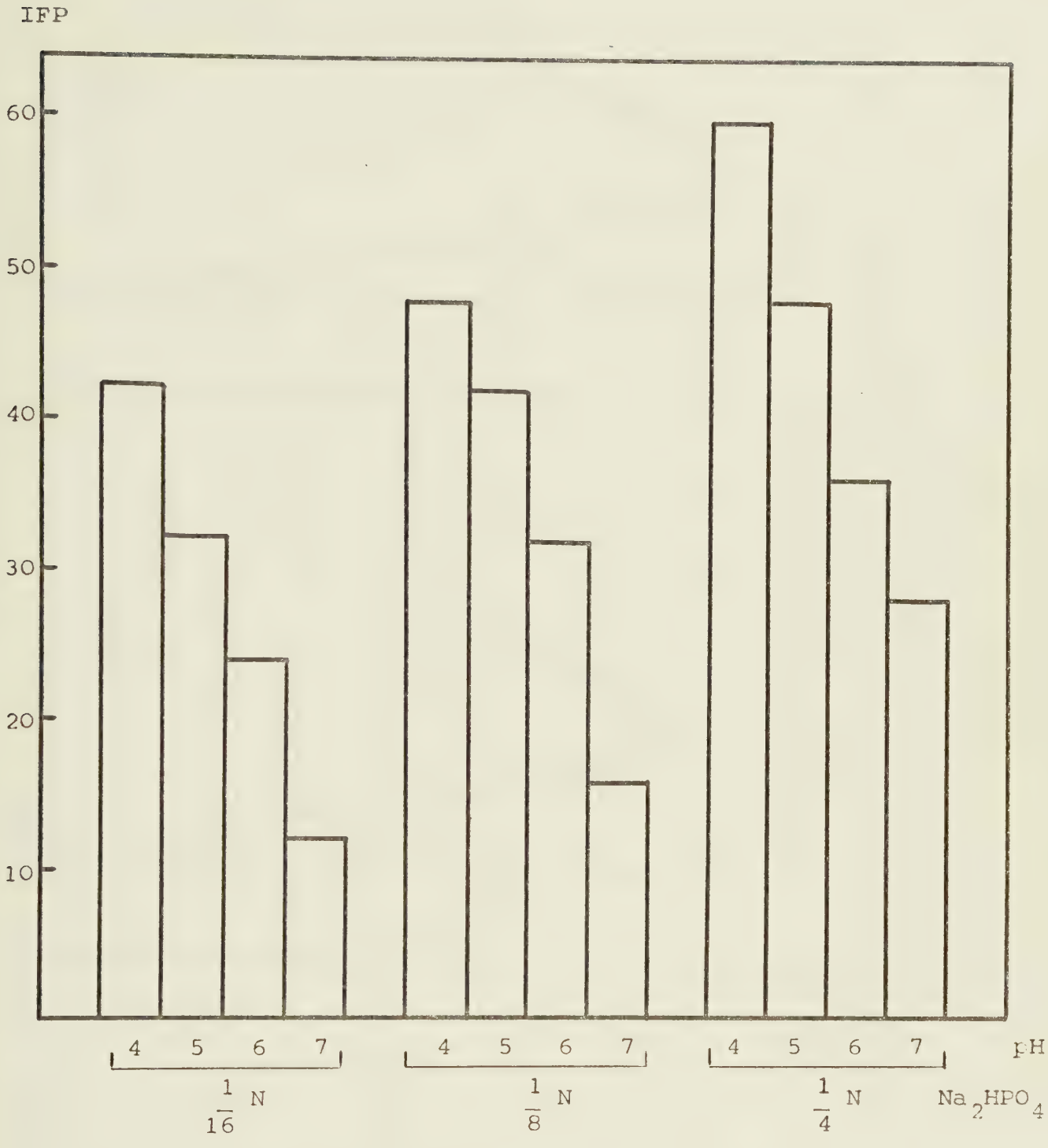


Figure 57 - Variation de l'IFP de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en phosphate sodique et du pH. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M.

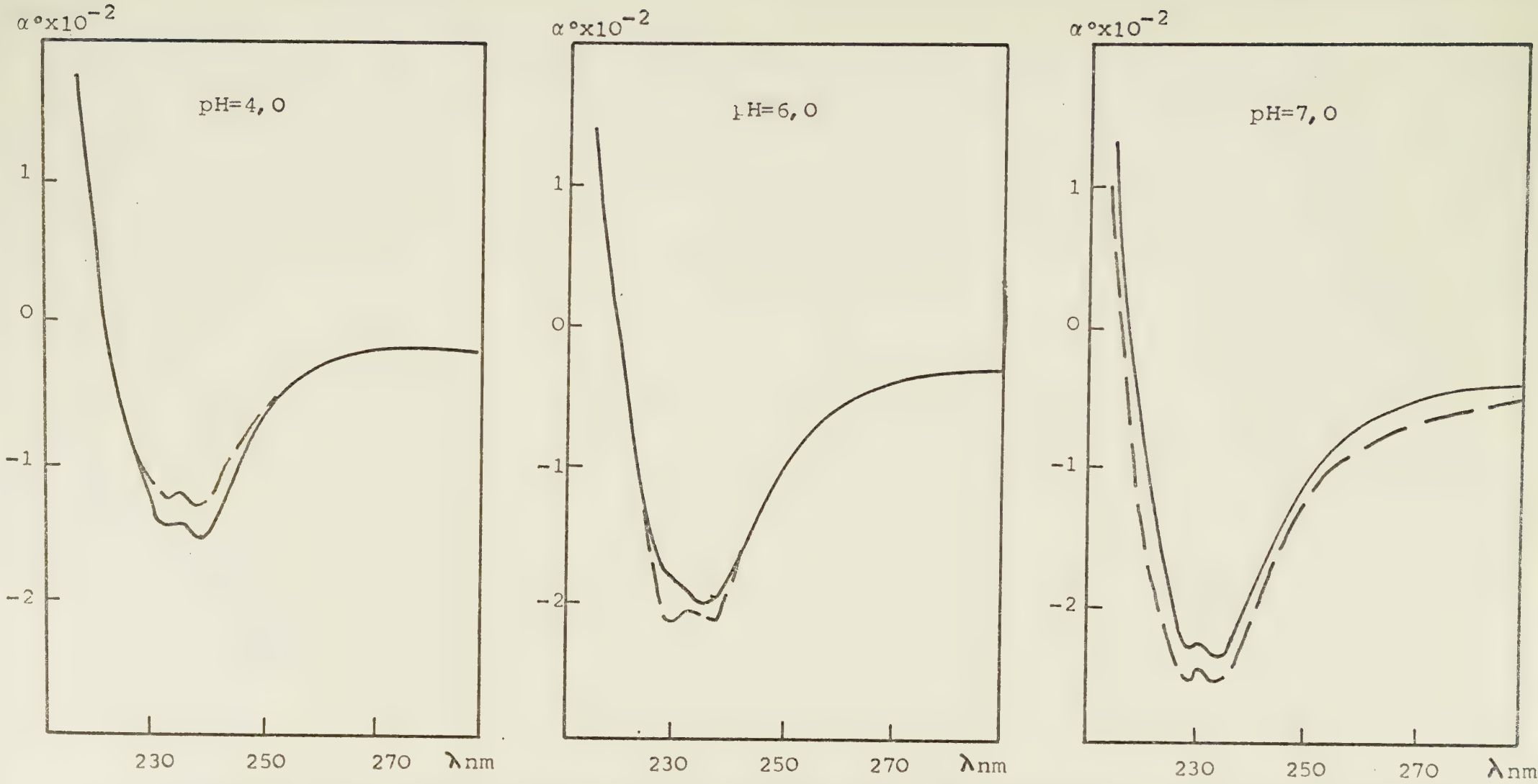


Figure 58 - Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans une solution de phosphate sodique à (1/16M).

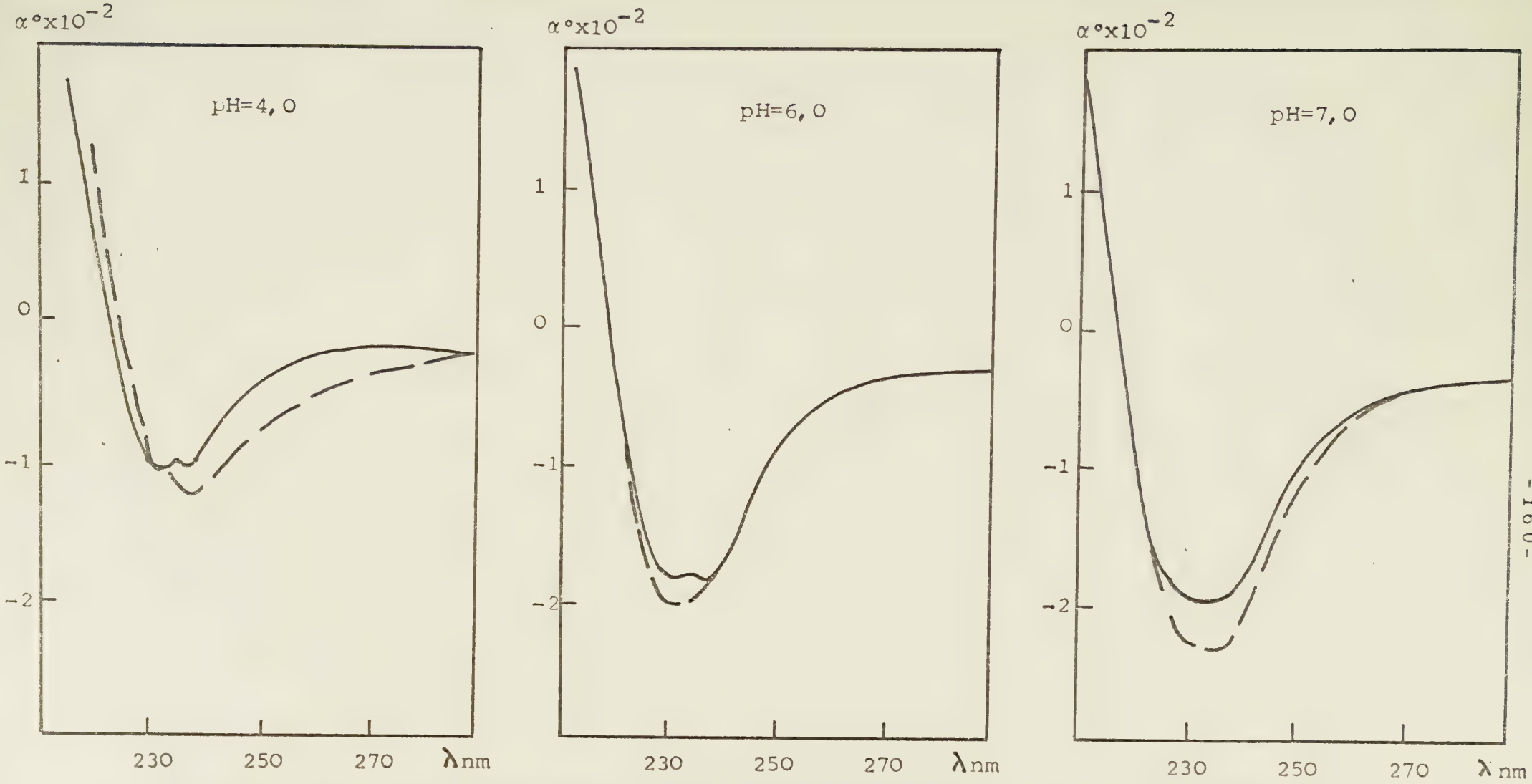


Figure 59 - Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans une solution de phosphate sodique à (1/8M).

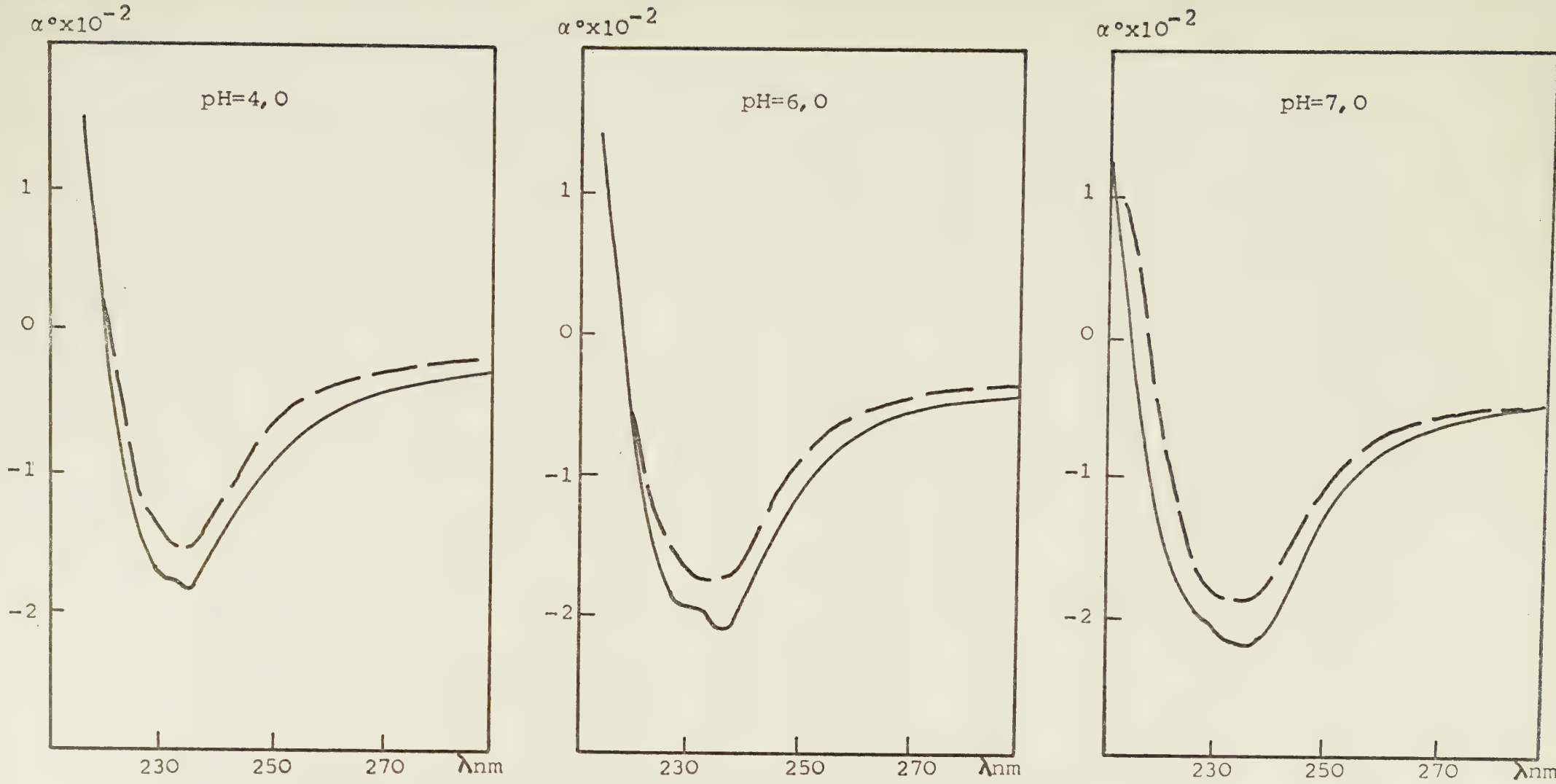


Figure 60 - Comparaisons des spectres de DOR des solutions de β-lactoglobuline et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique dans une solution de phosphate sodique à (1/4M).

intensité de fluorescence diminuée par rapport à celle de la protéine placée dans les mêmes conditions, et ceci pour toutes les concentrations salines et valeurs du pH. Fig. 61.

IV- Pyrophosphate et tripolyphosphate.

La présence d'ortho-phosphate de sodium, avons-nous vu, permet la fixation d'importantes quantités d'ac. ascorbique sur la β-lactoglobuline et ces quantités sont toujours nettement supérieures à celles qui se fixent sur cette protéine en un milieu dépourvu de salinité.

Il a donc paru intéressant de rechercher si cette propriété était commune à tous les acides oxygénés renfermant du phosphore.

A cette fin, l'expérimentation a été conduite en utilisant du pyrophosphate assez fréquemment rencontré dans les organismes vivants et du tripolyphosphate couramment ajouté aux saumures utilisées en charcuterie.

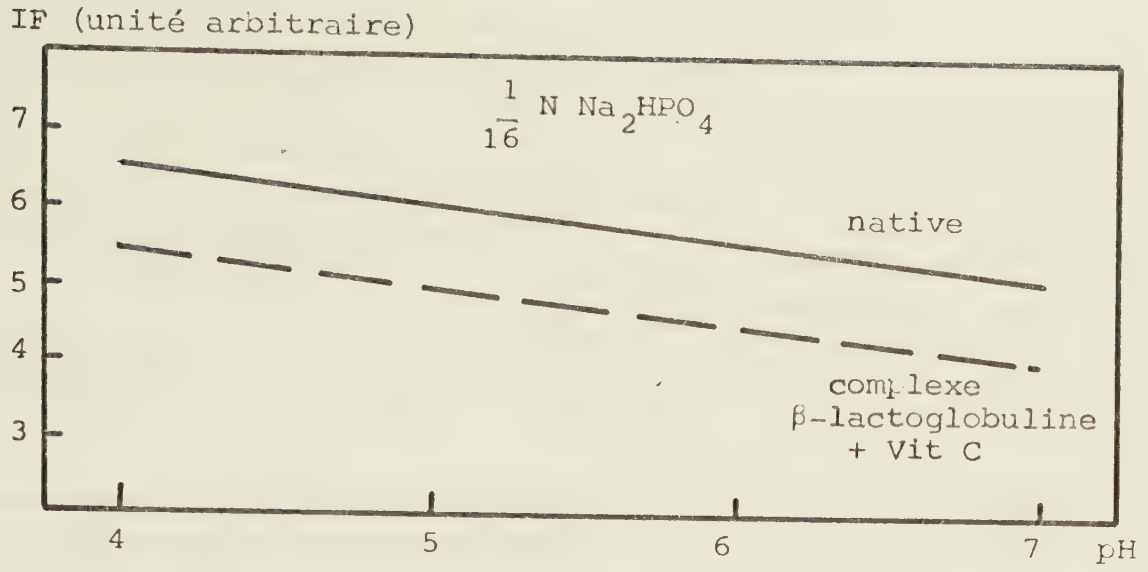
1- Pyrophosphate ($Na_4P_2O_7$)

— a- Importance de la fixation.

L'ion pyrophosphorique n'agit pas comme l'ortho-phosphorique. En effet, sa présence n'augmente pas l'importance de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline à pH = 6,0 et 7,0 par rapport à ce que l'on constate en milieu non salin. A pH = 4,0 et 5,0 toutefois, on note une certaine augmentation de la fixation mais celle-ci est toujours moins élevée que dans le cas de l'ortho-phosphate et elle diminue lorsque le pH croît. (tableau XXXV et fig. 62).

Notons encore que lorsque la concentration en pyrophosphate passe de N/8 à N/4, l'importance de la fixation demeure constante, ce qui n'était pas le cas pour PO_4Na_3.

— b- Etude spectropolarimétrique.



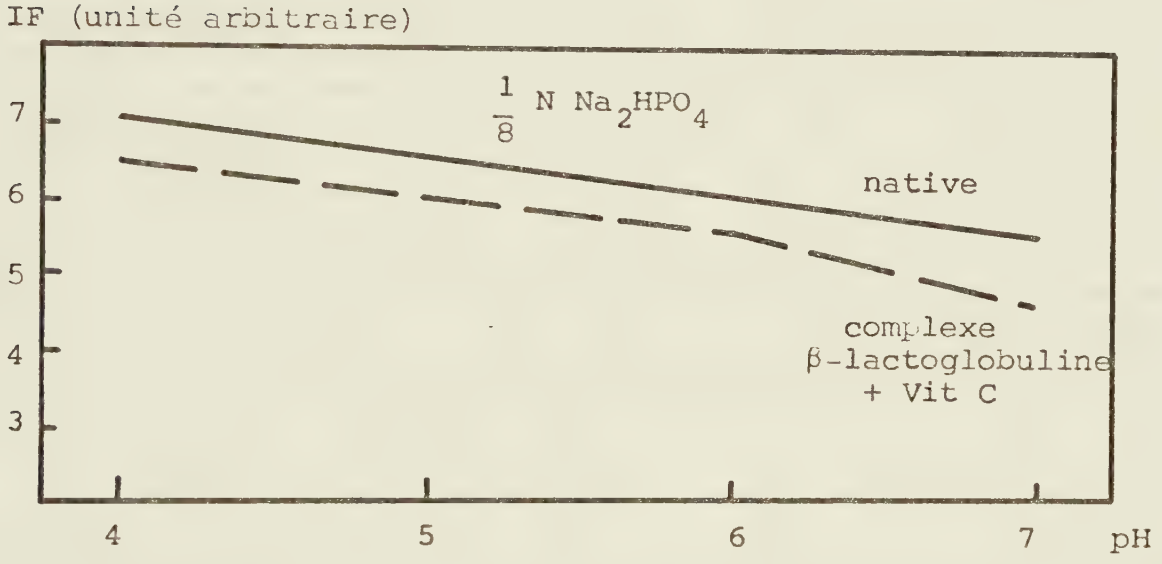


Figure 61 - Variations comparées du maximum de l'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline avant et après la fixation de l'acide ascorbique en fonction de la concentration en phosphate sodique et du pH.

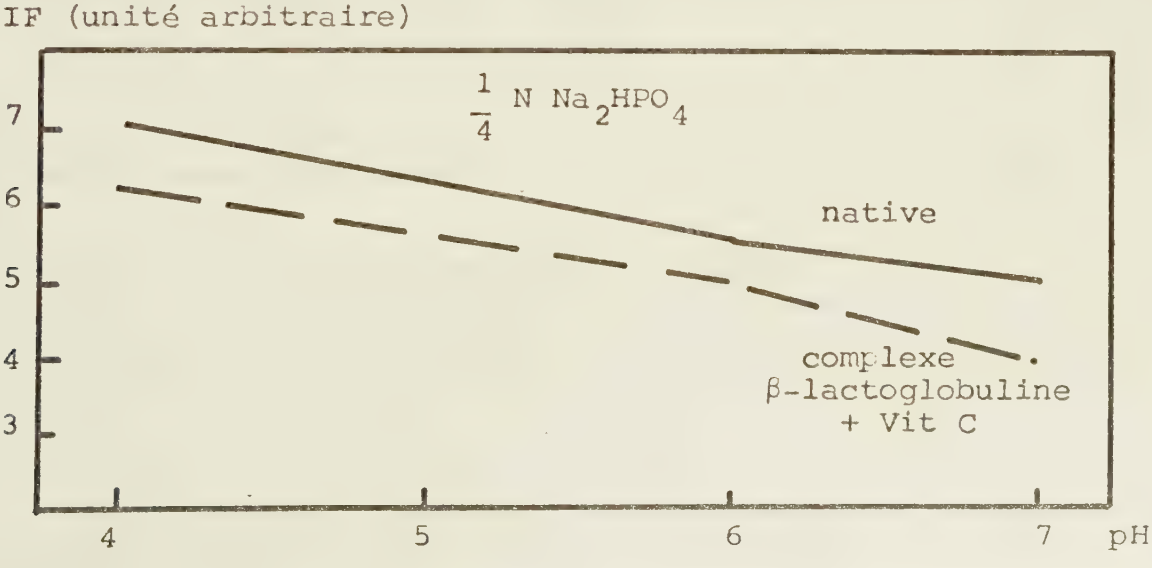


Tableau XXXV-

pH	Expression de la fixation	Concentration en $Na_4P_2O_7$		
		1/16N	1/8N	1/4N
4,0	IFP	21,6	28	28
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	47	60,4	60,4
5,0	IFP	20	26,4	27
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	40	54	55,2
6,0	IFP	16	18	18
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	37	41,9	41,9
7,0	IFP	5,6	8	8
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	7	10	10

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en pyrophosphate de sodium et du pH. (β-lactoglobuline à 0,5 g/l ; acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M ; température +20°C.)

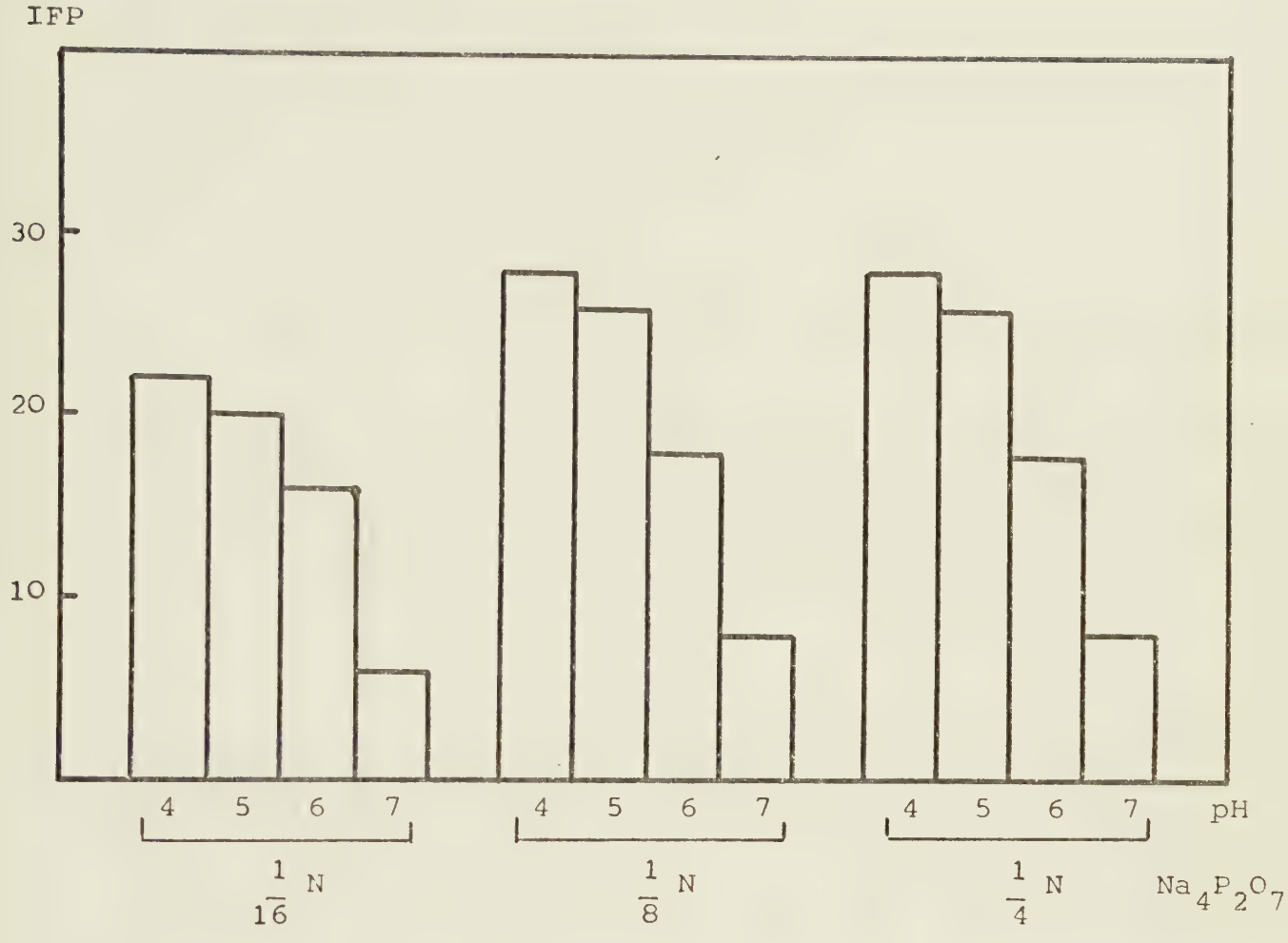


Figure 62 - Variation de l'IFP de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en pyrophosphate sodique et du pH.

Ainsi que le fait se produit à pH = 6, 0 et 7, 0, dans le cas de l'ortho-phosphate, l'organisation spatiale du complexe ascorbique peut devenir ici moins structurée que celle de la β-lactoglobuline en présence des mêmes concentrations salines. Cependant cette diminution de la structuration se constate simplement quand la concentration de pyrophosphate est N/8. Dans tous les autres cas, on note une augmentation apparente de la structuration (tableau XXXVI).

2- Tripolyphosphate ($Na_5P_3O_{10}$).

—a- Répercussion sur l'importance de la fixation.

Le tripolyphosphate se comporte qualitativement comme le pyrophosphate mais il permet une complexation plus abondante de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline. Le niveau de fixation demeure cependant inférieur à celui enregistré en présence d'acide ortho-phosphorique (tableau XXXVII et fig. 63).

—b- Etude spectropolarimétrique.

Sa présence entraîne un accroissement de la structuration du complexe ascorbique par rapport à celle de la β-lactoglobuline en un milieu de même salinité sauf à pH = 4, 0 et à condition que la concentration en tripolyphosphate soit N/16 ou N/8. Il n'y a donc pas entière concordance avec ce qui a été constaté aussi bien dans le cas de l'ortho que pour celui du pyrophosphate (tableau XXXVIII).

XII- Effet d'un contact préalable de la β-lactoglobuline avec NaCl sur le niveau de fixation de l'acide ascorbique.

L'expérimentation précédemment conduite sur la sérum albumine avait montré que ce n'était pas la concentration finale du milieu de fixation en NaCl mais la concentration saline initiale de la solution protéique qui conditionnait le niveau de fixation de l'acide ascorbique.

On a présentement vérifié si cette régle est valable dans le cas de la β-lactoglobuline.

Tableau XXXVI-

pH	Concentration en $Na_4P_2O_7$	$-(m')_{235}$	
		-lactoglobuline en présence de $Na_4P_2O_7$	Complexe -lactoglobuline + acide ascorbique
4,0	1/16N	965,8	1229
	1/8N	1417	1756
	1/4N	1141	1417
5,0	1/16N	1682,7	2020,4
	1/8N	1843,8	1682,7
	1/4N	1843,8	2020,4
6,0	1/16N	1843,8	2020,4
	1/8N	2282	2020
	1/4N	1931	2107

Variations des pouvoirs rotatoires spécifiques en fonction de la concentration en pyrophosphate de sodium et du pH. Acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M ; Température 20°C, β-lactoglobuline 0,5 g/l.

Tableau XXXVII-

pH	Expression de la fixation	Concentration en $Na_5P_3O_{10}$		
		1/16N	1/8N	1/4N
4,0	IFP	28	29,6	29,6
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	60,4	64	64
5,0	IFP	27	28,8	28,8
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	55	59	59
6,0	IFP	18	24	24
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	41,9	56	56
7,0	IFP	8	13,6	13,6
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	10	17	17

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en tripolyphosphate de sodium et du pH. (β-lactoglobuline à 0,5 g/l ; acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M ; Température + 20°C.)

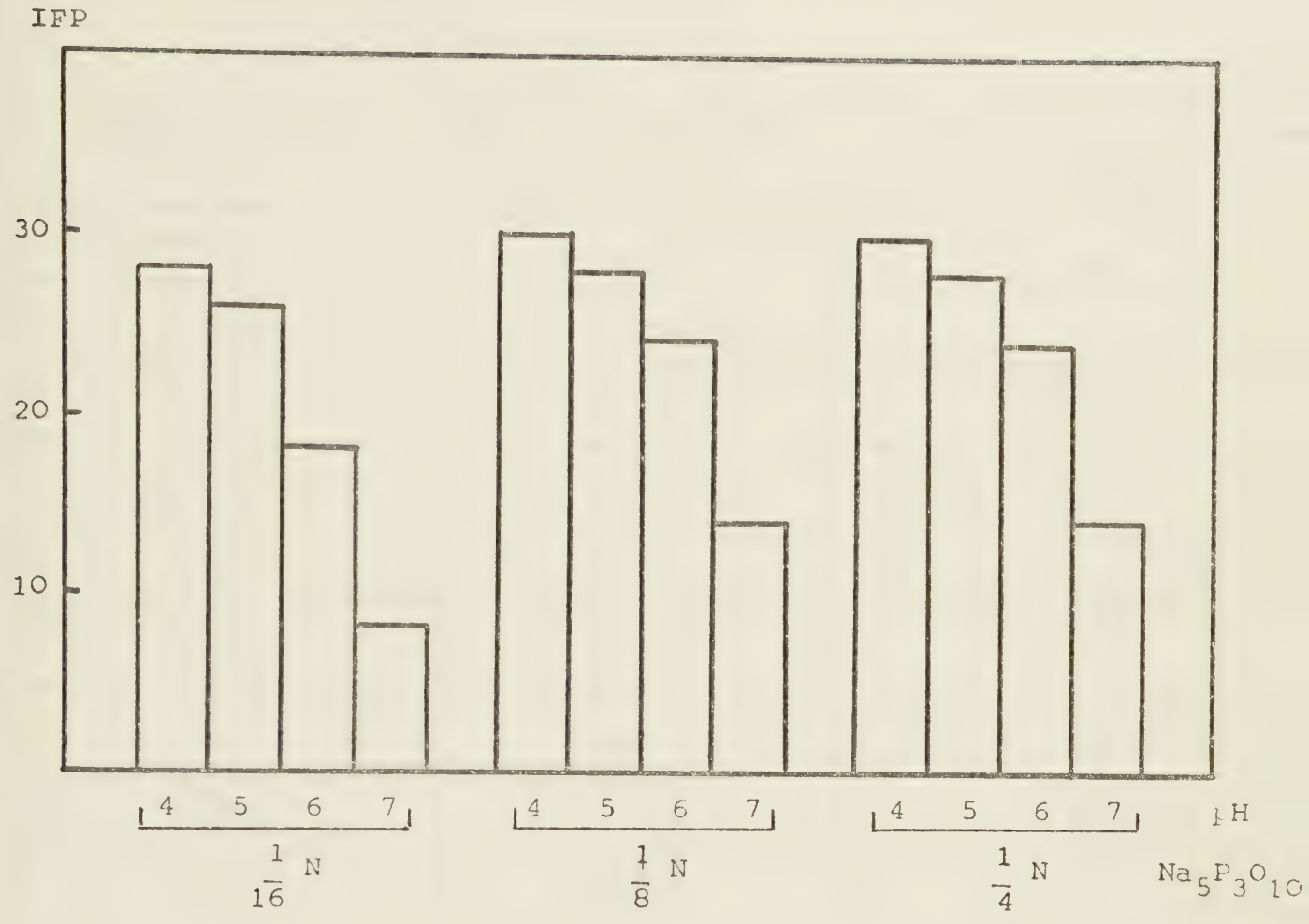


Figure 63 - Variation de l'IFP de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration en tripolyphosphate de sodium et du pH.

Tableau XXXVIII-

pH	Concentrations en $Na_5P_3O_{10}$	$-(m')_{235}$	
		β-lactoglobuline	Complexe β-lactoglobuline vitamine C
4,0	1/16N	1141,4	878
	1/8N	1492,6	1141,4
	1/4N	1317	1492,6
6,0	1/16N	1756	2020,4
	1/8N	1756	1931
	1/4N	1931	2107
7,0	1/16N	1843,8	2020
	1/8N	1931	2107
	1/4N	2020,4	2200

Variations des pouvoirs rotatoires spécifiques $(m')_{235}$ en fonction, de la concentration en tripolyphosphate de sodium et du pH.

Les molarités initiales de NaCl dans la solution protéique sont M/8 - M/4 - M/2.

Etant donné que la concentration en NaCl de la solution ascorbique est toujours nulle, la molarité finale de chaque mélange des solutions protéiques (initialement 1g/l) et vitaminique (initialement 5×10^{-3}M) sera deux fois moindre. L'amplitude de la fixation a été évaluée à divers pH.

12-1- Résultats.

Ils sont exposés tableau XXXIX et fig. 64 et montrent que :

- Pour une concentration saline donnée, l'importance de la fixation passe par un maximum au voisinage de pH=6,0

- Les quantités d'acide ascorbique fixées diminuent avec la concentration saline et s'annulent lorsque la molarité finale du mélange réactionnel est M/4.

L'allure générale de la fixation du ligand présente donc des différences très nettes avec celle constatée pour la sérum albumine.

- Ici, le niveau de fixation n'est plus indépendant de la concentration saline, et ce niveau ne diminue plus au fur et à mesure que le pH croît entre 4,0 et 7,0.

- La seule similitude de comportement de la sérum albumine et de la β-lactoglobuline est l'abaissement de l'importance de la fixation du ligand par rapport à ce qu'elle atteint lorsque l'on met au contact des solutions iso-hyalines.

- Notons enfin qu'en utilisant la présente technique de fixation, celle-ci s'annule pour une concentration finale de M/4 alors qu'il fallait qu'elle atteigne M/2 pour que l'on enregistre le même résultat si en mélangeant des solutions iso-hyalines.

On ne manquera pas de remarquer que dans les deux cas la fixation devient nulle lorsque la

Tableau XXXIX-

H	Expression de la fixation	Concentration initiale (.)en NaCl de la solution protéique		
		1/8M	1/4M	1/2M
0	IFP	5	1,6	0
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	10,79	3,46	0
0	IFP	5,6	3,2	0
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	11,4	6,55	0
0	IFP	6,4	4	0
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	14,8	9,3	0
0	IFP	1,6	0,8	0
	moles d'ac. ascorbique/ mole de β-lactoglobuline	2	1	0

(.) Les concentrations finales sont deux fois plus faibles.

Variation de la fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration initiale de NaCl des solutions protéiques à divers pH.

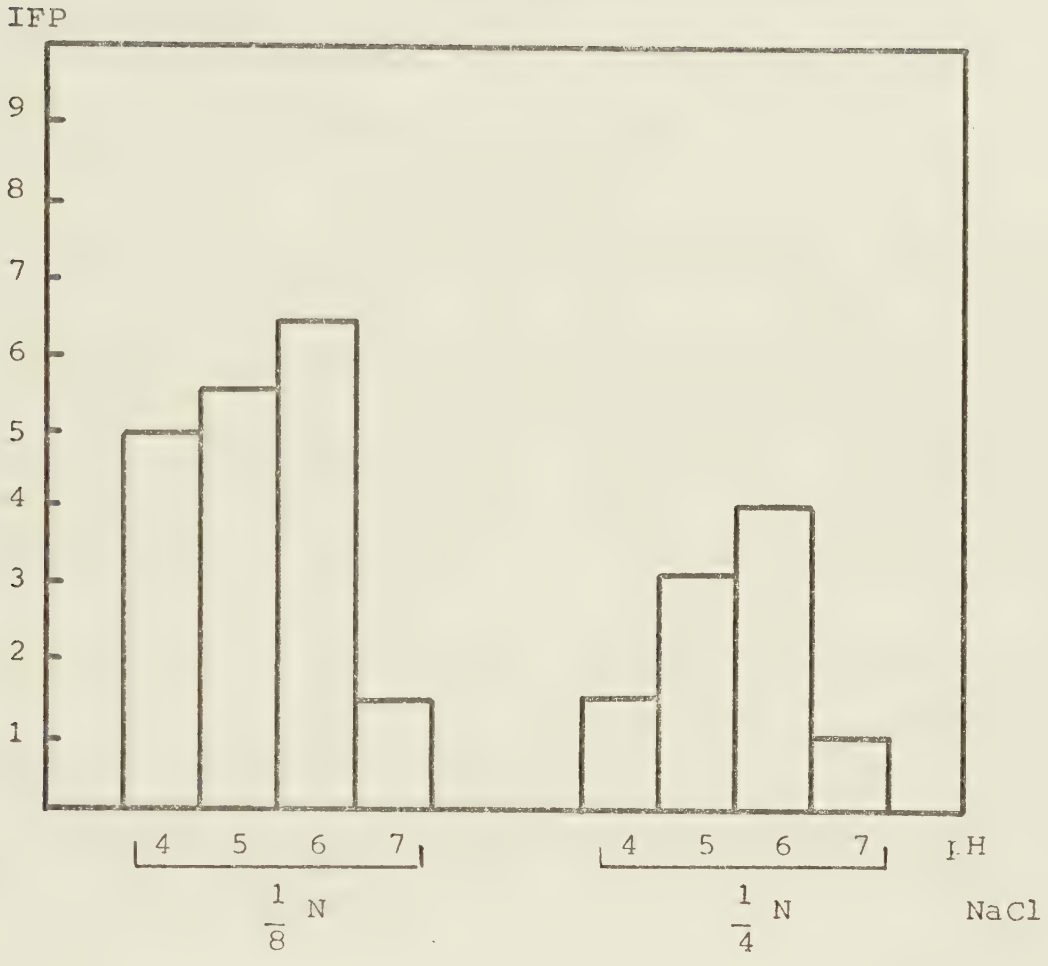


Figure 64 - Variation de l'IFP de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline en fonction de la concentration saline initiale des solutions protéiques et du pH.

solution de β-lactoglobuline a été placée en milieu NaCl M/2. C'est donc le niveau initial de la concentration saline au contact de la protéine et non la concentration saline finale du milieu où s'effectue la fixation qui conditionne l'importance de celle-ci.

12-2- Etude spectropolarimétrique.

Son intérêt est différent de celui que présente le cas de la sérum albumine où l'importance de la fixation ne dépendait plus de la concentration saline. Ici, une plus grande imprégnation saline préalable de la β-lactoglobuline accentue simplement l'allure d'un phénomène constaté en mélangeant des solutions isohyalines. Il est donc normal de supposer que pour une fixation de niveau comparable en ligand, les modifications de la structure protéique seront, elles aussi, comparables. C'est ce que traduisent les résultats du tableau XXXX.

12-3- Etude spectrofluorimétrique.

Pour la même raison que celle qui vient d'être exposée à l'occasion de l'étude spectropolarimétrique, l'intensité de fluorescence ne devrait pas sensiblement varier par rapport à celle d'un complexe réalisé en un milieu salin différent mais renfermant la même quantité d'acide ascorbique.

C'est ce que confirme la comparaison des tracés de la figure 65 acec ceux de la figure 41.

XIII- Résistance du complexe β-lactoglobuline -acide ascorbique en présence de NaCl.

Réalisé en milieu exempt de NaCl puis placé en milieu salin, un complexe de sérum albumine/acide ascorbique perd une partie du ligand préalablement fixée. La perte est d'autant plus importante que la quantité de ligand complexé est élevée. Elle s'accroît lorsque la salinité et le pH augmentent. Il en est de même dans le cas de la β-lactoglobuline (tableaux XXXXI et XXXXII.)

Tableau XXXX-

pH	Concentrations salines initiales(.)	$-(m')_{235}$	
		β-lactoglobuline en présence de sel	Complexe β-lactoglobuline acide ascorbique
4, 0	1/8M	1229	1054
	1/4M	1452	1229
5, 0	1/8M	1141	1580
	1/4M	1417	1493
6, 0	1/8M	1756	1934
	1/4M	1756	1844
7, 0	1/8M	1492	1682
	1/4M	1580	1844

(.) Les concentrations salines finales sont deux fois plus faibles.

Variation du pouvoir rotatoire spécifique à 235 nm en fonction des concentrations salines initiales et du pH. β-lactoglobuline à 0,5 g/l, acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M. Température 20°C.

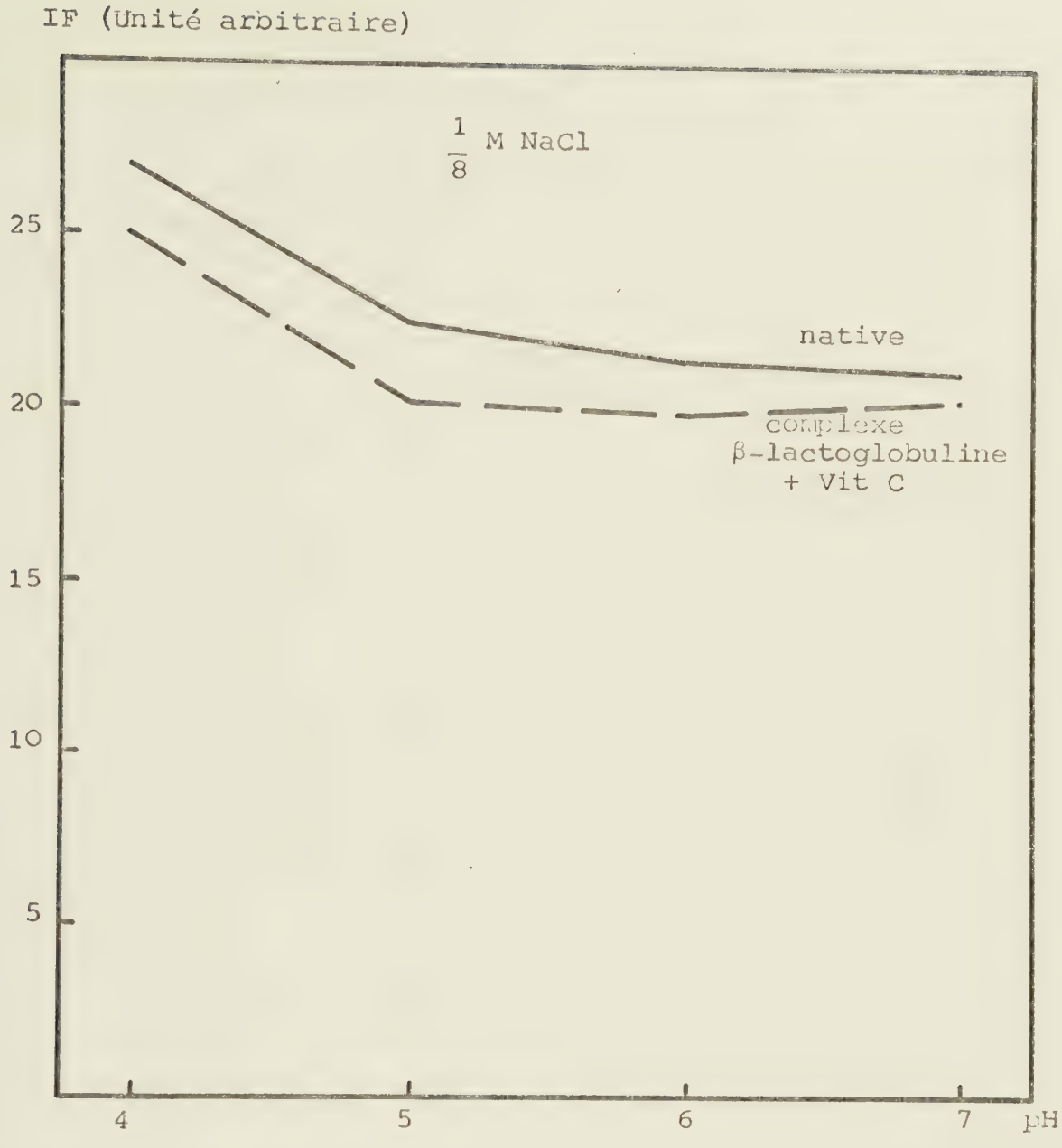


Figure 65 -a- Variations comparées en fonction de la concentration saline initiale et du pH, du maximum de l'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline préalablement mise au contact d'une solution saline deux fois plus concentrée que la concentration finale avant d'être placés au contact de la solution d'acide ascorbique en solution non saline.

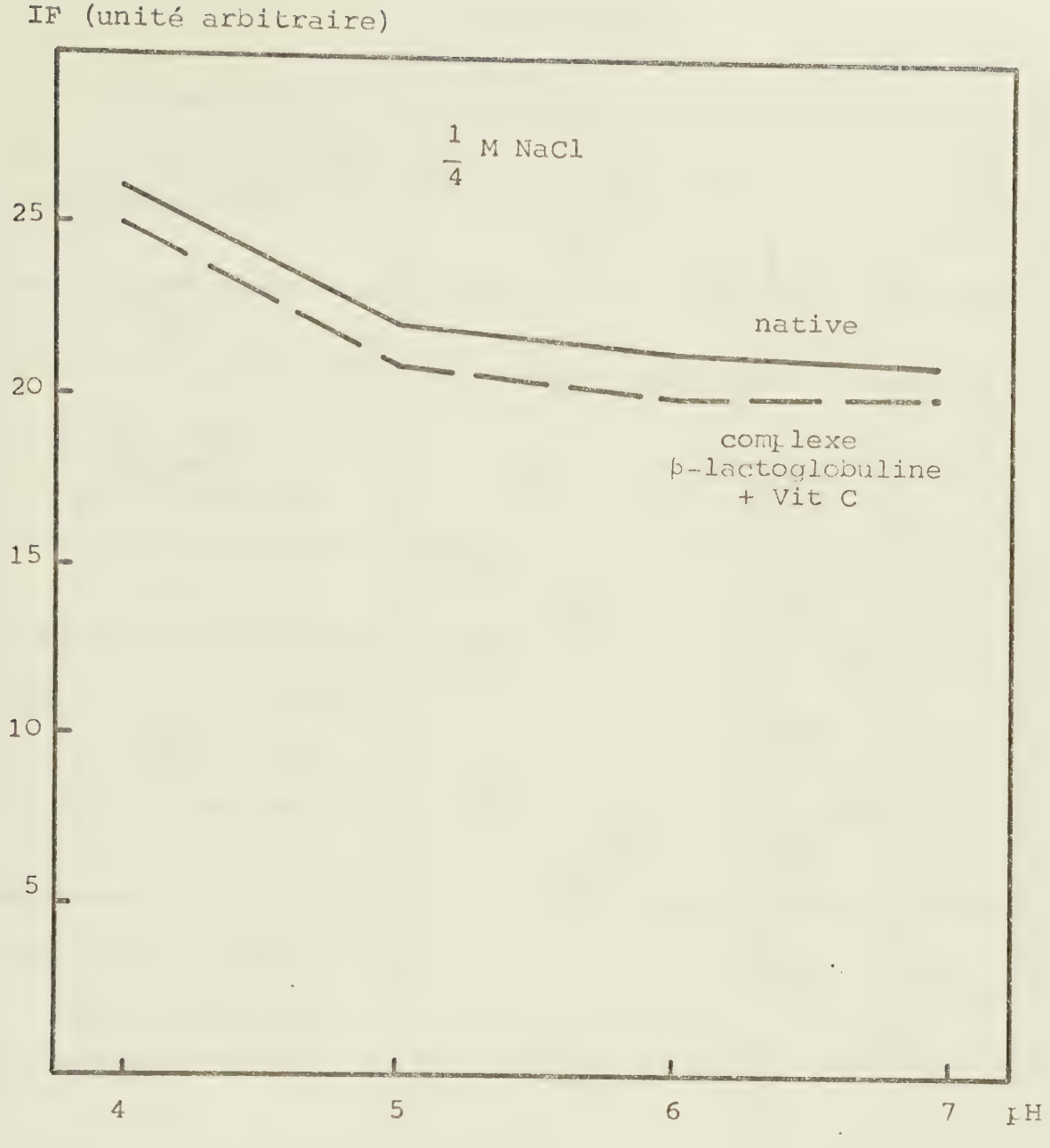


Figure 65-b- Variations comparées en fonction de la concentration saline initiale et du pH, du maximum de l'intensité de fluorescence de la β-lactoglobuline préalablement mise au contact d'une solution saline deux fois plus concentrée que la concentration finale avant d'être placées au contact de la solution d'acide ascorbique en solution non saline.

Tableau XXXXI-

pH	Expression des quantités demeurant fixées	Quantités primitivement fixées (.)	Concentrations finales en NaCl		
			1/8M	1/4M	1/2M
4, 0	IFP	11, 6	10, 4	10	9, 2
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	25	22, 4	21, 58	19, 85
5, 0	IFP	11, 2	9, 2	8	7
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	22, 9	18, 8	16, 36	14, 3
6, 0	IFP	19, 2	14	13	10, 8
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	44, 7	32, 6	30, 18	25
7, 0	IFP	13, 2	7	4, 4	3, 6
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	16, 5	8, 75	5, 5	4, 5

(.) Les chiffres de cette colonne indiquent l'importance de la fixation de l'ac. ascorbique sur la β-lactoglobuline avant que, dans un deuxième temps, on place le complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique en solutions salines dont la concentration est indiquée en tête des trois colonnes de droite.

Variation des quantités d'acide ascorbique demeurant fixées sur la β-lactoglobuline après addition de diverses concentrations salines et à différents pH. Concentration finale en acide ascorbique $1,25 \times 10^{-3}$M. Température 20°C.

Tableau XXXXII-

pH	Expression des quantités demeurant fixées	Quantités primitivement fixées (.)	Concentrations finales en NaCl		
			1/8M	1/4M	1/2M
, 0	IFP	20	17	16	15
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	43, 16	36, 7	34, 52	32, 3
, 0	IFP	16	12	11	10, 8
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	32, 72	24, 5	22, 5	22
, 0	IFP	24	17	13	11
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	55, 9	39, 6	30, 28	25, 6
, 0	IFP	21, 6	10, 4	4	2, 4
	moles d'ac. ascorbique / mole de β-lactoglobuline	27	13	5	3

(.) Les chiffres de cette colonne indiquent l'importance de la fixation de l'ac. ascorbique sur la β-lactoglobuline avant que dans un deuxième temps, on place le complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique en solution saline dont la concentration est indiquée en tête des trois colonnes de droite.

Variation des quantités d'acide ascorbique demeurant fixées sur la β-lactoglobuline après addition de diverses concentrations salines et à différents pH. Concentration finale en acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M. Température 20°C.

13-1- Commentaires.

De l'étude de ces tableaux, il ressort que :

Quelle que soit la concentration saline, il demeure toujours une certaine quantité de figand fixée (fig. 66, 67 68, 69, 70, 71, 72.)

- Pour une concentration saline donnée, le départ de ligand s'amplifie lorsqu'augmente le pH du milieu.

- Pour un pH donné le départ de l'acide ascorbique croît lorsque la concentration saline augmente.

- Pour un pH donné et une concentration saline donnée, le départ est d'autant plus important que la quantité d'acide ascorbique primitivement incluse dans le complexe est élevée (c'est-à-dire que la concentration en acide ascorbique du milieu dans lequel s'est formé le complexe est elle-même élevée.)

- Lorsqu'on fixe le ligand en présence de l'eau et que l'on ajoute ultérieurement NaCl, les quantités de ligand demeurant fixées sont bien plus importantes que si la fixation avait été réalisée d'emblée en présence de la même concentration en NaCl.

Ici encore sur un plan pratique, il y aurait intérêt à fixer d'abord l'acide ascorbique en l'absence de sel si la conservation du complexe devait s'effectuer en milieu salin.

13-2- Etude spectropolarimétrique.

Si l'on compare l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton de la β-lactoglobuline en milieu salin M/8 et M/4 avec celui du complexe élaboré en milieu non salin puis partiellement privé de son ligand par séjour en milieu NaCl aux concentrations précitées, on note une diminution d'autant plus notable de l'amplitude de cet extrêmum que l'acidité du milieu croît (Tableaux XXXXIII et XXXXIV).

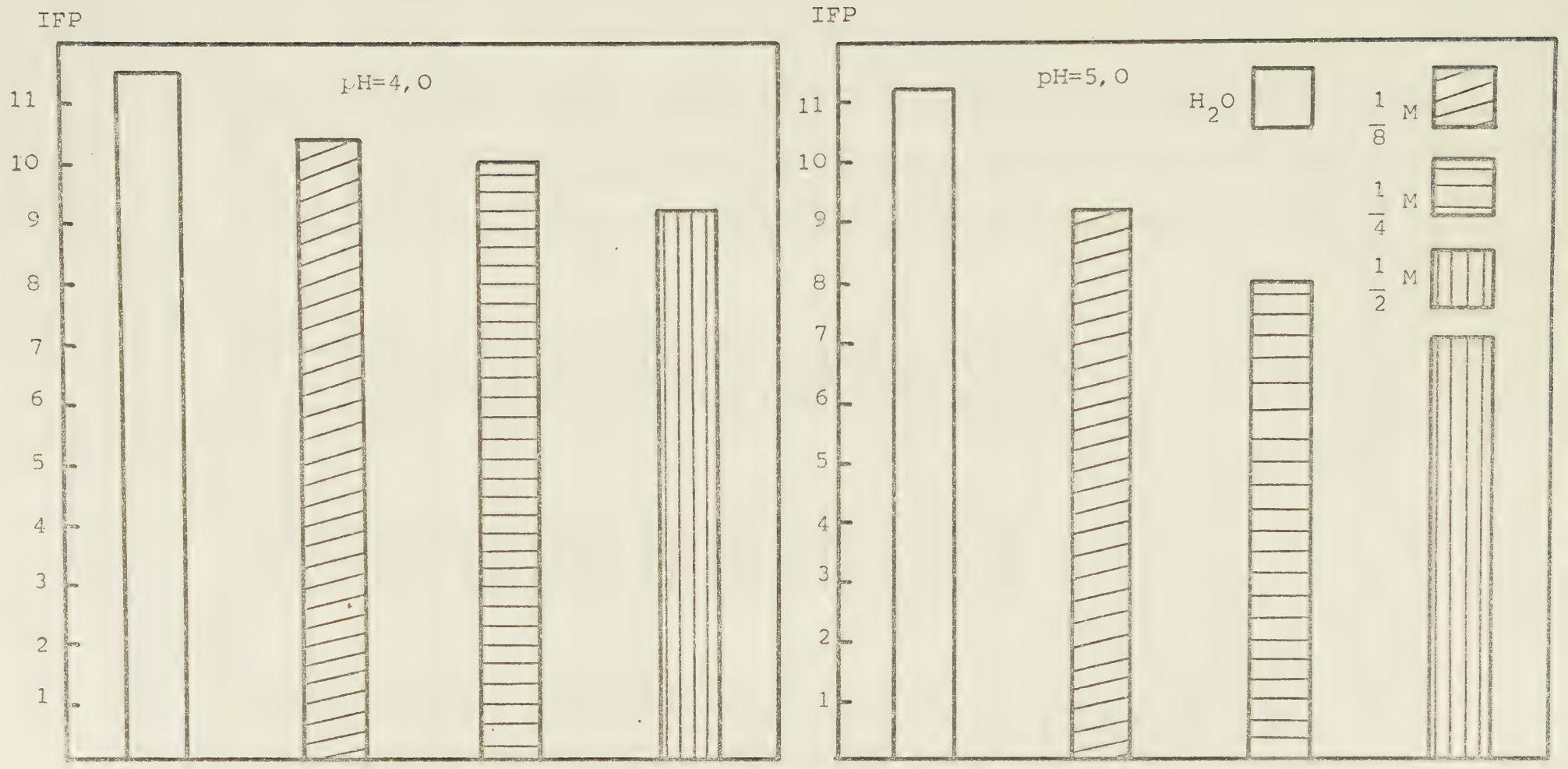


Figure 66 - Variation de l'IFP demeurant fixées sur la β-lactoglobuline après addition de diverses concentrations salines et à pH = 4, 0 et 5, 0. Concentration initiale en acide ascorbique $1,25 \times 10^{-3}$M.

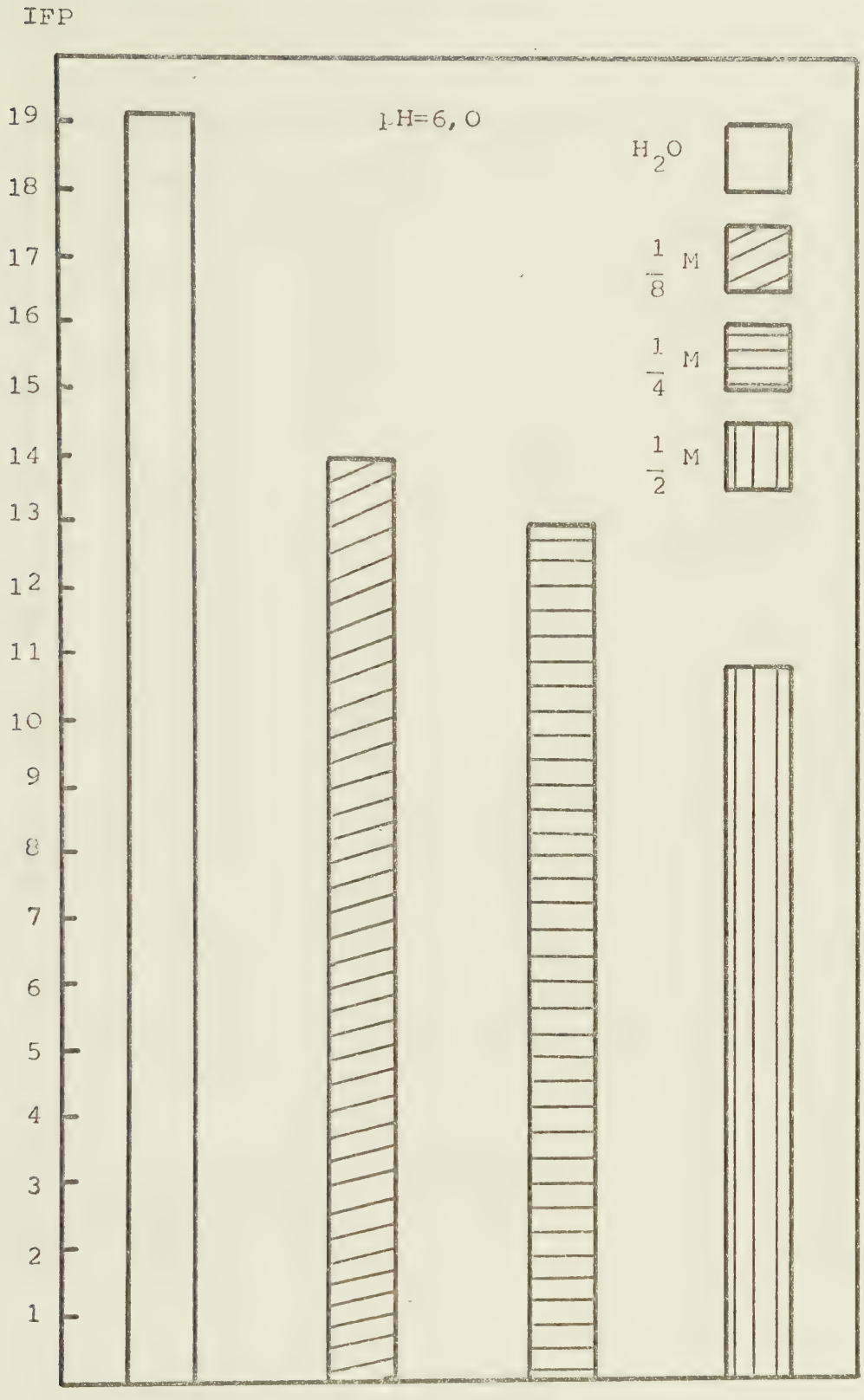


Figure 67 - Variation de l'IFP demeurant fixées sur la β-lactoglobuline après addition de diverses concentrations salines et à pH = 6, 0. Concentration initiale en acide ascorbique $1,25 \times 10^{-3}$M.

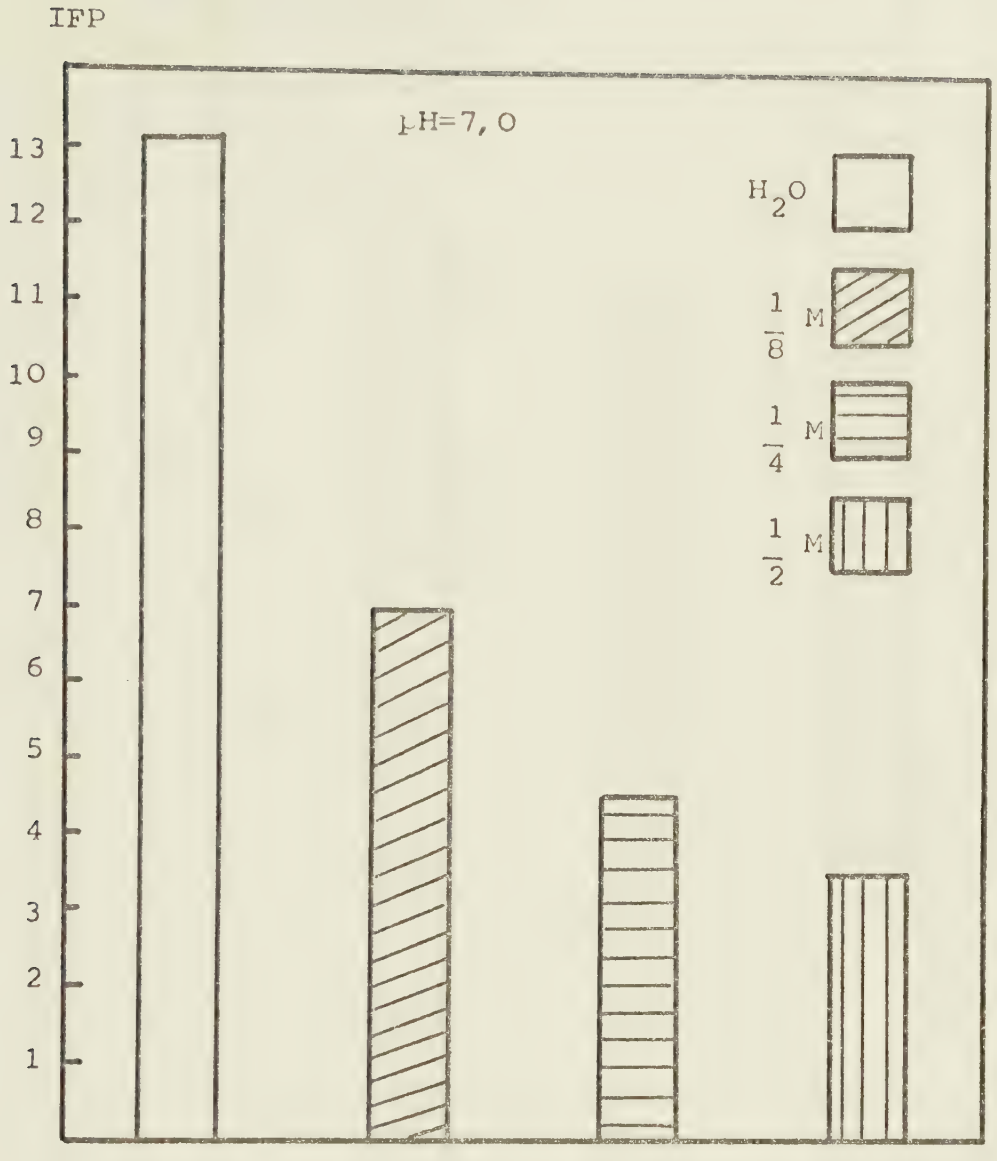


Figure 68 - Variation de l'IFP demeurant fixées sur la β-lactoglobuline après addition de diverses concentrations salines et à pH = 7, 0. Concentration initiale en acide ascorbique $1,25 \times 10^{-3}$M.

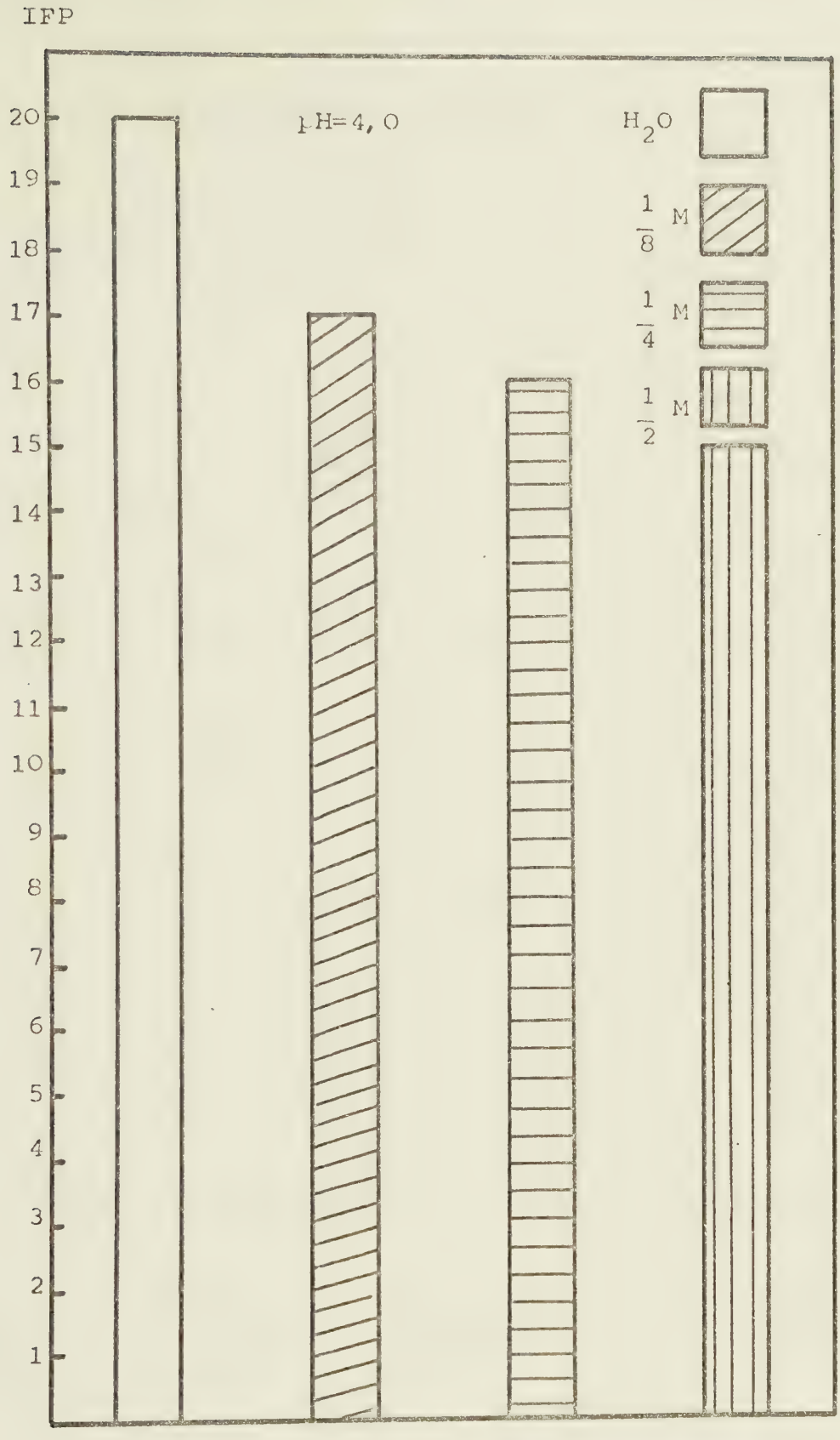


Figure 69 - Variation de l'IFP demeurant fixées sur la β-lactoglobuline après addition de diverses concentrations salines et à pH = 4, 0. Concentration initiale en acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M.

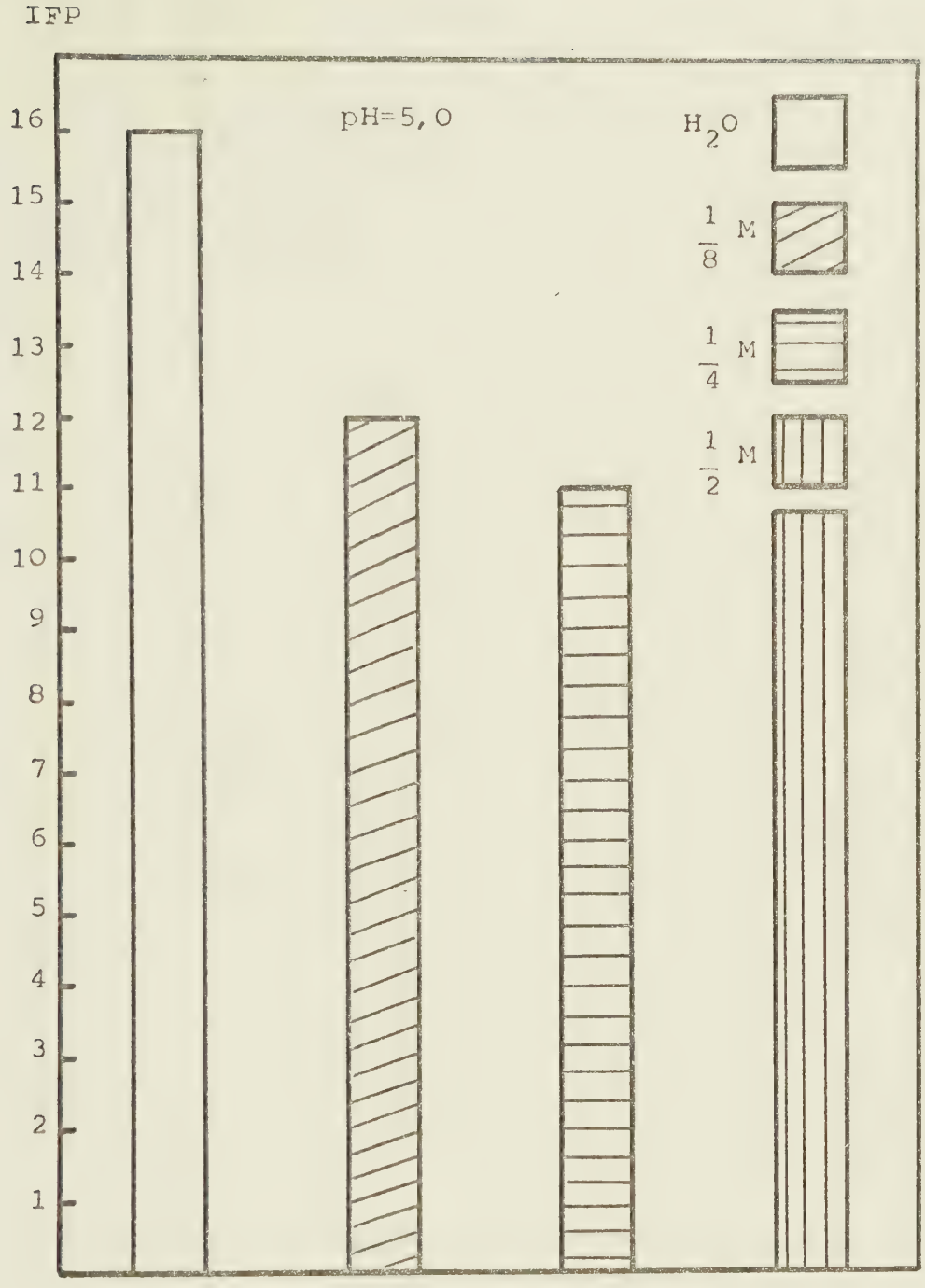


Figure 70 - Variation de l'IFP demeurant fixées sur la β-lactoglobuline après addition de diverses concentrations salines et à pH = 5, 0. Concentration initiale en acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$ M.

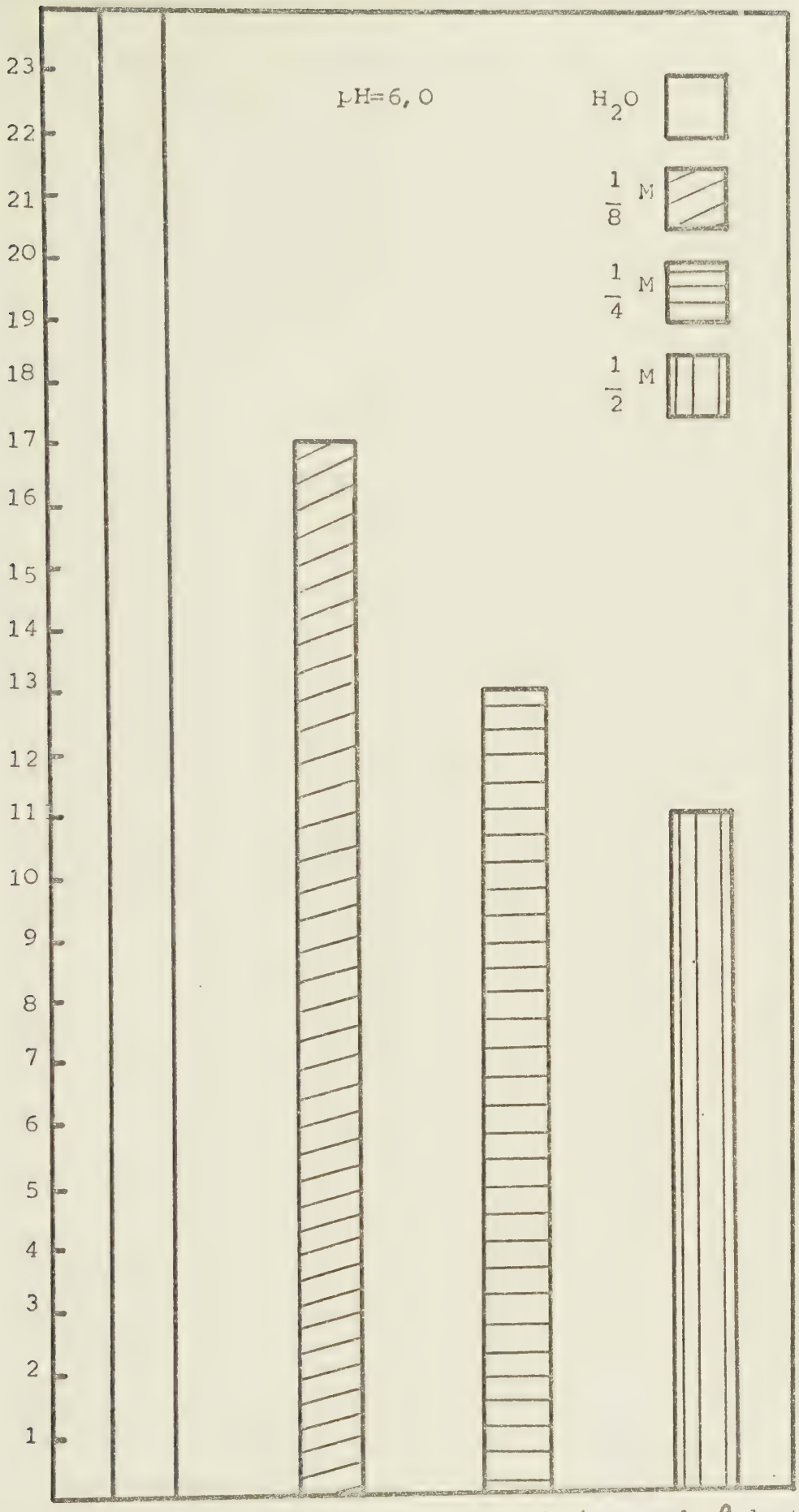


Figure 71 - Variation de l'IFP demeurant fixées sur la β-lactoglobuline après addition de diverses concentrations salines et à pH = 6, 0. Concentration initiale en acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M.

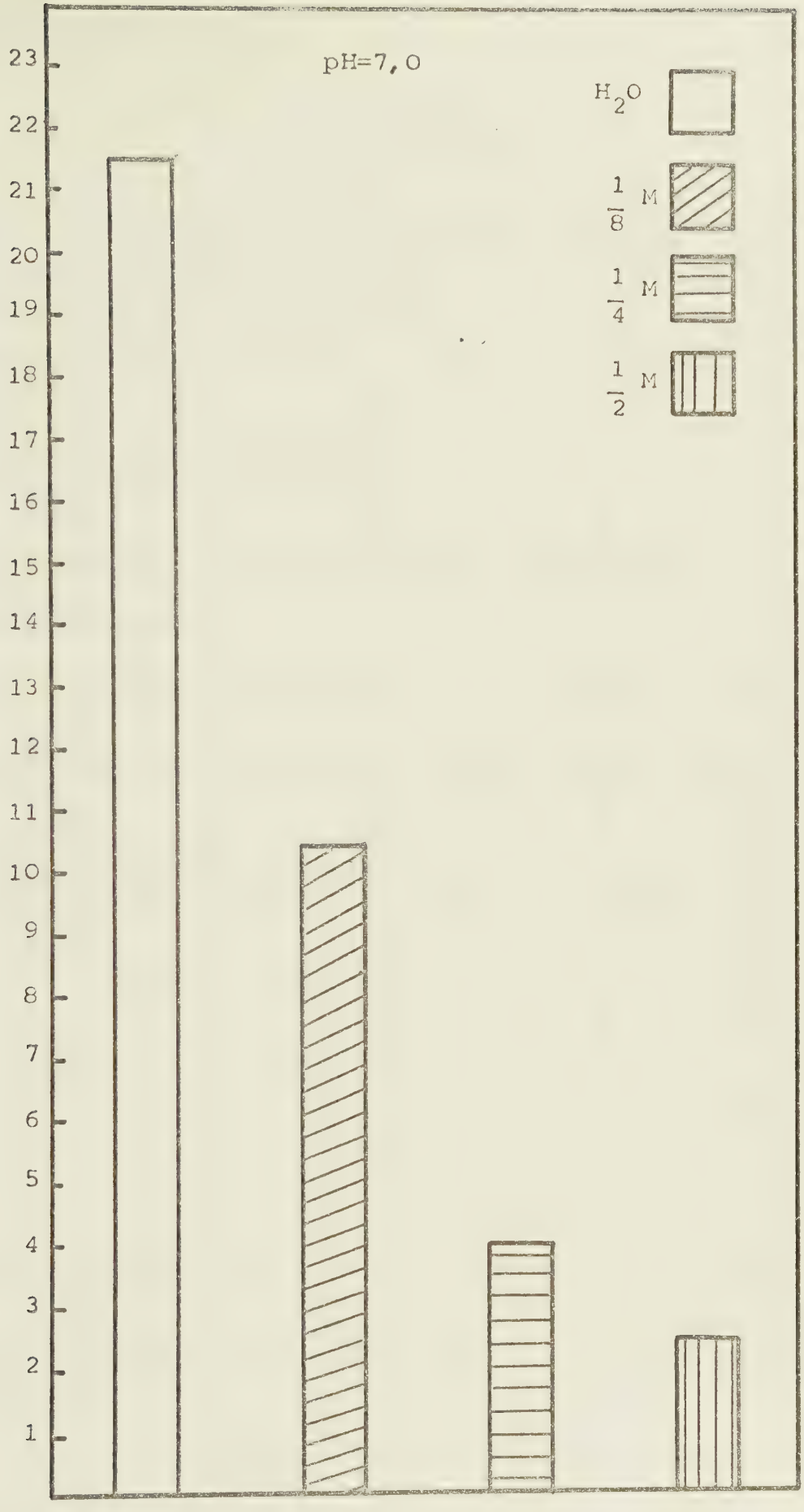


Figure 72 - Variation de l'IFP demeurant fixées sur la β-lactoglobuline après addition de diverses concentrations salines et à pH = 7,0. Concentration initiale en acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M.

Tableau XXXXIII-

pH	Concentrations salines finales	-(m')235	
		β-lactoglobuline + NaCl	Complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique
	1/8M	1452	790
4, 0	1/4M	1141	702
	1/2M	1200	526, 8
	1/8M	-	-
5, 0	1/4M	-	-
	1/2M	-	-
	1/8M	1756	1317
6, 0	1/4M	1843	1417
	1/2M	1756	1500
	1/8M	1580	1300
7, 0	1/4M	1580	1317
	1/2M	1417	1300

Variations comparées du pouvoir rotatoire spécifique $[m']$ à 235 nm , de solutions de β-lactoglobuline en milieu salin et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique formé en milieu non salin et demeuré stable en un milieu salin à diverses concentrations et pH. Les concentrations initiales en acide ascorbique sont celles qui résultent de la fixation en un milieu $1,25 \times 10^{-3}$M. acide ascorbique Température 20°C.

Tableau XXXXIV-

H	Concentrations salines finales	-(m')235	
		β-lactoglobuline + NaCl	Complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique
	1/8M	1452	1141
,0	1/4M	1141	965,8
	1/2M	1200	790
(.) ,0		- - -	- - -
	1/8M	1756	1417
,0	1/4M	1843	1682
	1/2M	1756	1500
	1/8M	1580	1380
0	1/4M	1580	1420
	1/2M	1417	1380

-(•) Dans les conditions expérimentales adoptées, les mesures effectuées ne présentent pas la précision requise.

Variations comparées du pouvoir rotatoire spécifique (m') à 235 nm de solutions de β-lactoglobuline en milieu salin et du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique formé en milieu non salin et demeuré stable en un milieu salin à diverses concentrations et pH. Les concentrations initiales en acide ascorbique sont celles qui résultent de la fixation en un milieu $2,5 \times 10^{-3}$M ac. ascorbique. Température 20°C.

Il est alors intéressant de rappeler que la formation d'un complexe ascorbique en présence de la même concentration d'acide ascorbique et en l'absence (tableau XXIII) ou en présence de NaCl (fig. 35, 36 et 37) fait croître l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton de la β-lactoglobuline quel que soit le pH.

- Dans le cas d'une fixation en milieu salin par exemple, cette amplitude est nettement supérieure à celle de la β-lactoglobuline dans un milieu de même concentration saline.

Dans les deux cas qui viennent d'être évoqués (absence ou présence de NaCl), la formation d'un complexe s'accompagnait d'une apparente "superstructuration" par rapport à celle de la protéine placée dans les mêmes conditions de pH et de salinité.

- Présentement au contraire l'enlèvement d'une partie du ligand provoque une très nette perturbation spatiale. Non seulement l'organisation de ce que l'on pourrait appeler le "complexe résiduel" témoigne d'une structuration nettement moins importante que celle du complexe dont on est parti, ce qui paraît normal, mais elle est aussi plus faible que celle de la protéine originale dans les mêmes conditions de pH et de salinité. Aucune explication de ce phénomène n'a pu être donnée, si ce n'est que le processus opératoire suivi entraîne la rupture d'un nombre inattendu de liaisons de faible énergie.

13-3- Etude spectrofluorimétrique.

Elle traduit assez bien les perturbations structurales qui viennent d'être évoquées.

La formation d'un complexe ascorbique en milieu non salin ou salin s'accompagne toujours d'une diminution de l'amplitude du maximum de fluorescence par rapport à ce que l'on observe pour la protéine native dans les mêmes conditions de salinité et de pH.

Lorsque l'on enlève une partie du ligand fixé en milieu dépourvu de sel, il paraitrait normal que

ce départ s'accompagne d'une augmentation plus ou moins marquée de la fluorescence.

Or c'est l'inverse qui se produit. L'enlèvement partiel du ligand s'accompagne d'une nouvelle diminution de la fluorescence. Il semblerait donc que la diminution de la structuration qui résulte de cet enlèvement s'accompagne d'un repli des restes d'acides aminés fluorescents (tryptophane et peut-être tyrosine) vers l'intérieur de la molécule. Fig. 73 et 74A - 74B.

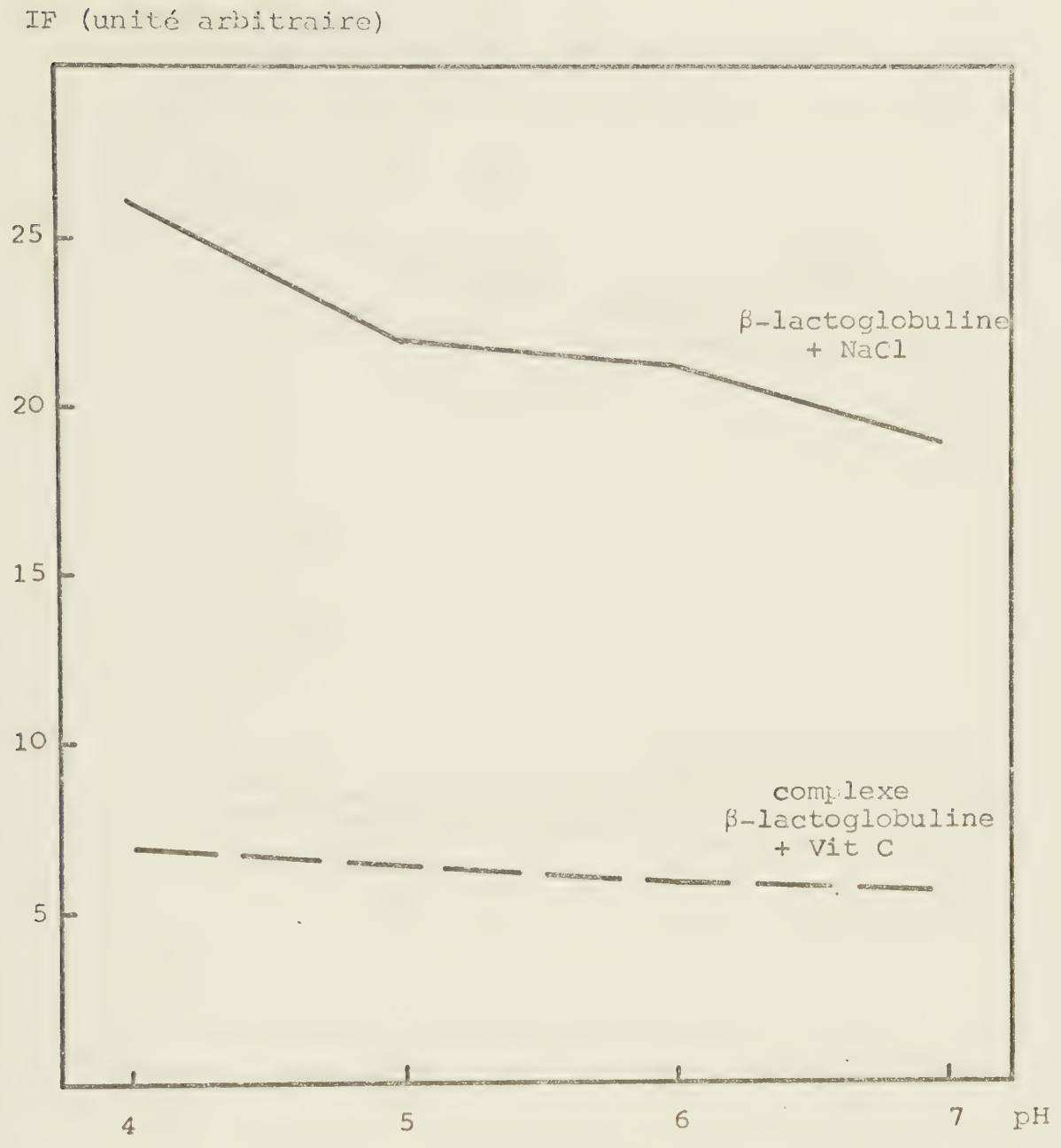


Figure 73 - Variations comparées de l'intensité de fluorescence de la solution de -lactoglobuline en milieu salin et de celle du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique formé en milieu non salin et demeuré stable en un milieu salin à diverses concentrations et pH. Concentration initiale en acide ascorbique $1,25 \times 10^{-3}$M.

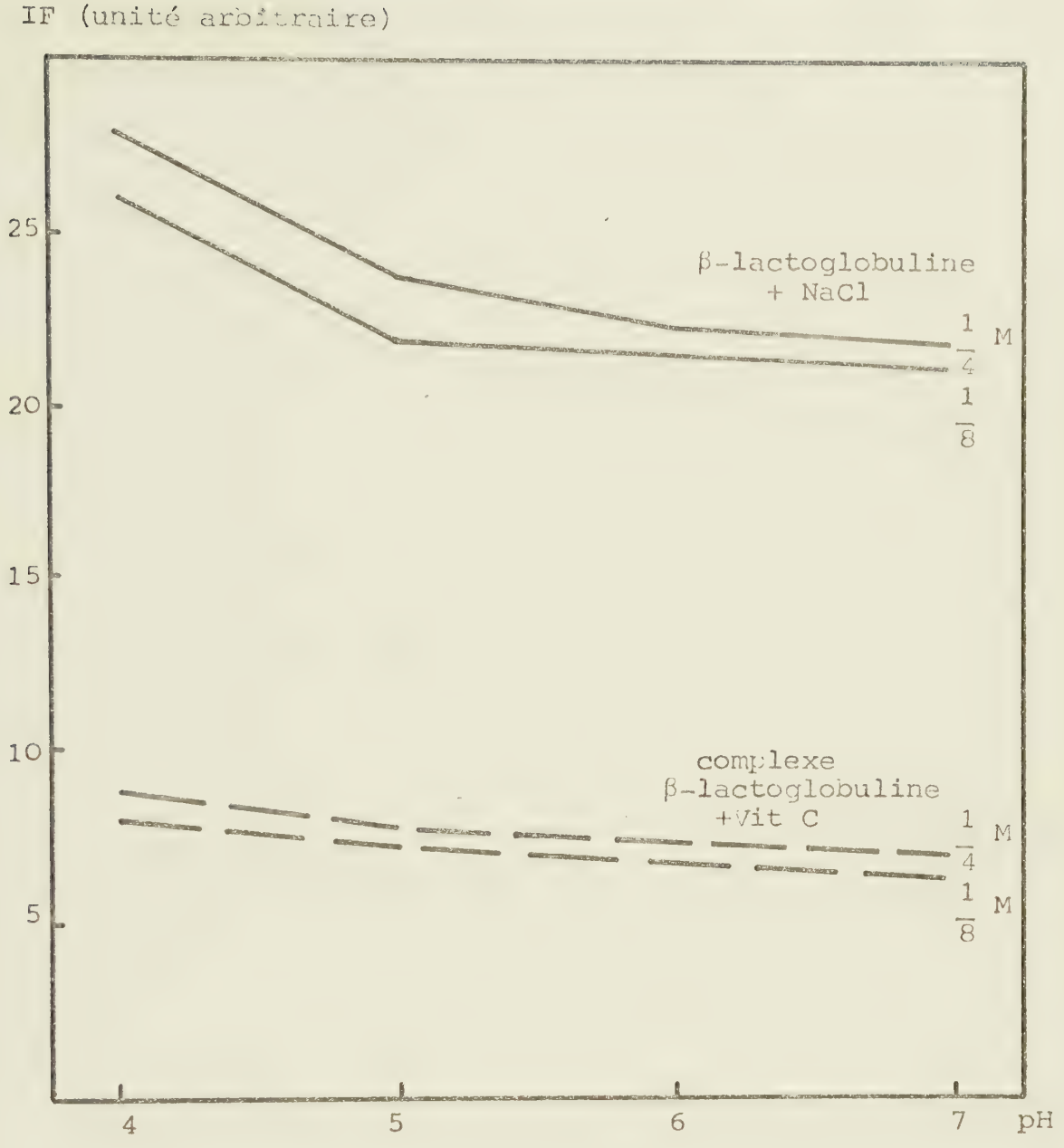


Figure 73 -b- Variations comparées de l'intensité de fluorescence de la solution de -lactoglobuline en milieu salin et de celle du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique formé en milieu non salin et demeuré stable en un milieu salin à diverses concentrations et pH. Concentration initiale en acide ascorbique $1,25 \times 10^{-3}$M.

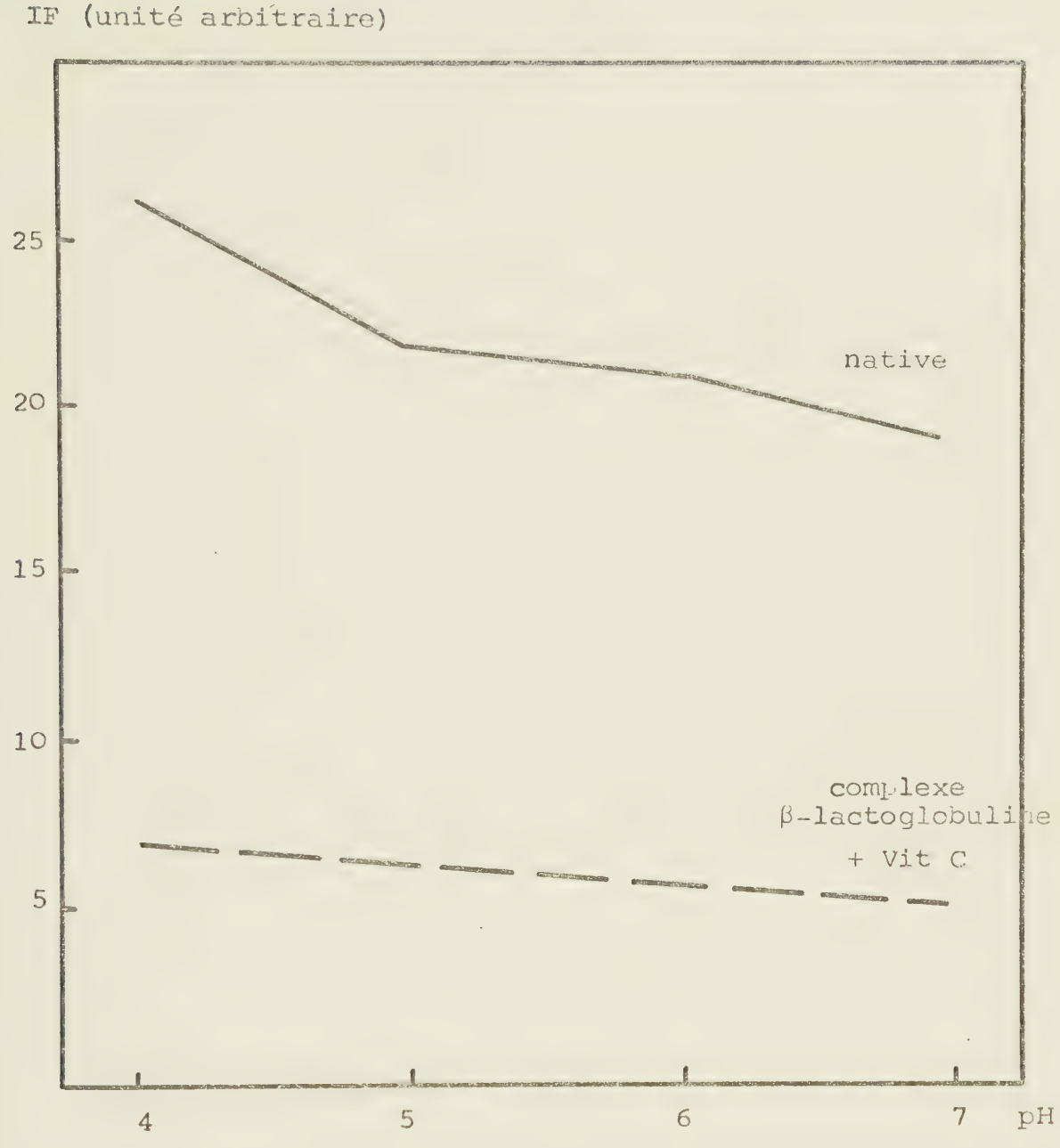


Figure 74-a- Variations comparées de l'intensité de fluorescence de la solution de β-lactoglobuline en milieu saline et de celle du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique formé en milieu non salin et demeuré stable en un milieu saline à diverses concentrations et du pH. Concentration initiale en acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M.

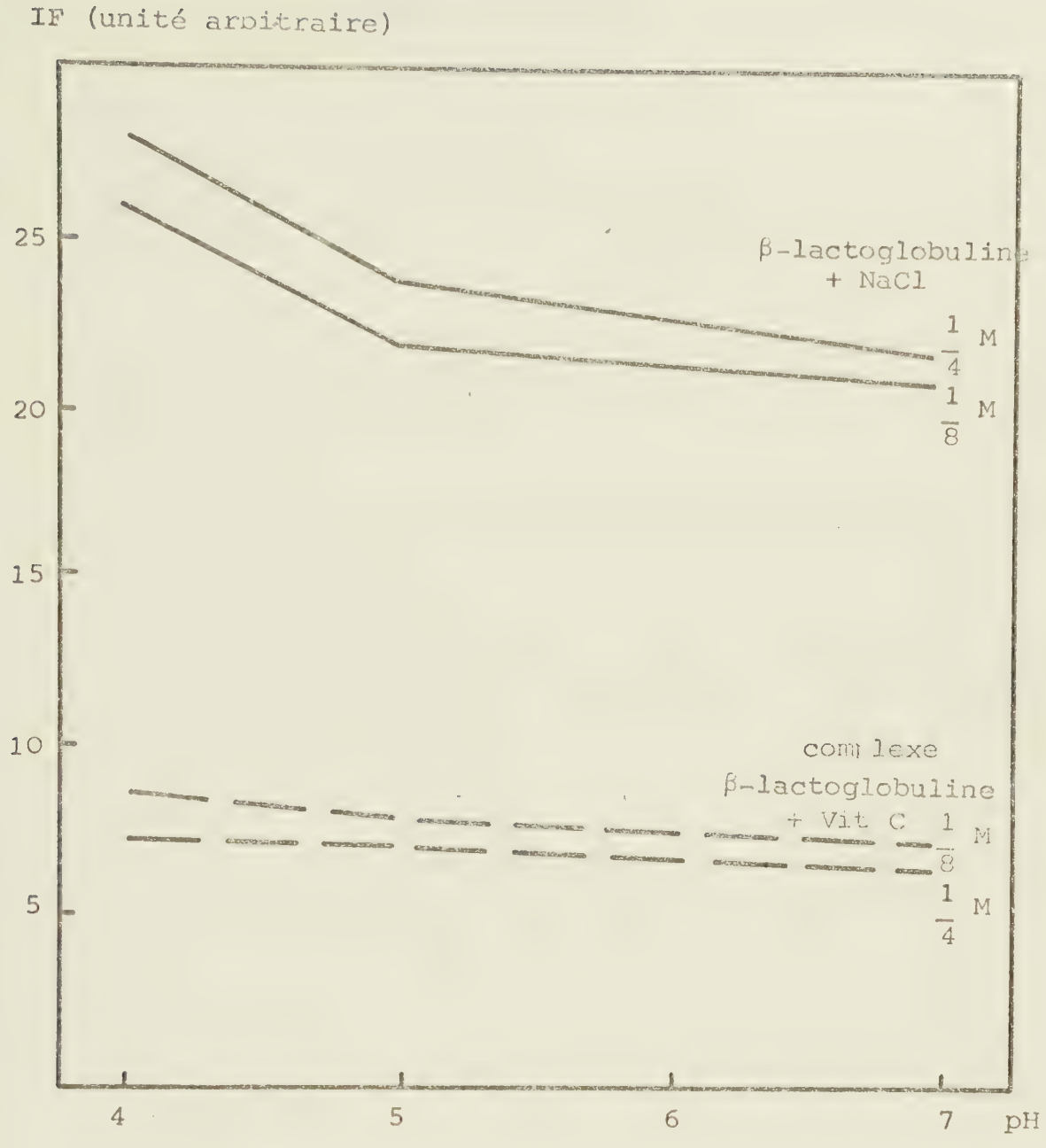


Figure 74 - b- Variations comparées de l'intensité de fluorescence de la solution de β-lactoglobuline en milieu salin et de celle du complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique formé en milieu non salin et demeuré stable en un milieu salin à diverses concentrations et de pH. Concentration initiale en acide ascorbique $2,5 \times 10^{-3}$M.

CONCLUSIONS DE LA 2me PARTIE.

La β-lactoglobuline bovine est une protéine capable de fixer de nombreux ligands dont l'acide ascorbique, mais elle fixe moins abondamment cet acide que la sérum albumine.

L'importance de cette fixation augmente avec le pH et atteint son maximum à pH = 6,0. Elle augmente aussi avec la concentration vitaminique et la température.

1- La concentration saline du milieu expérimental et la nature du sel en cause conditionnent l'amplitude de la fixation.

a- En présence de chlorures alcalins et pour des concentrations molaires en sel et en vitamine C respectivement constantes, l'importance de la fixation, toujours inférieure à ce qu'elle est en milieu non salin, s'inscrit dans l'ordre :

$$NaCl > KCl > LiCl$$

b- Dans les mêmes conditions et en présence de divers halogénures de Na, le niveau de fixation varie en fonction de la nature de l'halogéne selon :

$$I^+ > Cl^+ > F$$

c- Dans tous les cas, plus la concentration molaire est élevée, plus elle s'oppose à la fixation du ligand, et cette règle se vérifie pour toutes les valeurs de pH étudiées.

Aucune fixation de l'acide ascorbique sur la β-lactoglobuline n'est possible à quelque pH que ce soit si la concentration en halogénure alcalin est supérieure à 1/2M.

- Quand le sel de Na présent lors de la formation du complexe ascorbique n'est pas un halogénure, l'importance de la fixation de vitamine C augmente lorsque croît

sa concentration. Pareil fait avait été démontré dans le cas de la sérum albumine où l'expérimentation n'avait porté que sur l'ortho-phosphate de Na.

Dans le cas de la β-lactoglobuline, la démonstration s'est étendue aux nitrate, sulfate, ortho-phosphate, pyrophosphate et tripolyphosphate de Na à divers pH.

- Si on place d'abord la protéine dans un milieu chloruré sodique et la vitamine dans un milieu dépourvu de sel la quantité de ligand fixée lors de la formation du complexe est moins importante que dans le cas précédent.

Par contre si, en un premier temps, la vitamine est fixée sur la protéine en milieu non salin et si l'on ajoute le sel après formation du complexe, on s'aperçoit que la quantité de vitamine demeurant fixée est beaucoup plus importante que si le complexe ascorbique s'était formé en présence de la même concentration saline.

Les mesures spectropolarimétriques et spectrofluorimétriques montrent que les modalités de fixation de l'ac. ascorbique sur la β-lactoglobuline obéissent à des lois très complexes où interviennent le pH, la concentration vitaminique et la concentration saline.

Comme dans le cas de la sérum albumine, la fixation de l'ac. ascorbique sur la β-lactoglobuline s'accompagne en règle générale :

a- d'une augmentation de la structuration du complexe par rapport à celle de la protéine native. Il est vraisemblable ici encore d'attribuer cette augmentation à une organisation hélicoïdale des molécules d'eau et de ligand autour de la chaîne protéique.

b- D'une diminution de l'intensité de fluorescence du complexe par rapport à celle de la β-lactoglobuline. La complexation semblant donc s'accompagner d'un masquage des restes d'ac aminésque fluorescents (tryptophane, tyrosine) peut-être provoqué par le repli vers l'intérieur de la molécule protéique.

L'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton de la β-lactoglobuline ne varie que très

peu si l'on passe d'un milieu non salin à un milieu salé. Par contre, la fixation de l'ac. ascorbique s'accompagne d'une nette augmentation de cette amplitude. On peut donc penser que les halogénures qui s'opposent à la fixation d'ac. ascorbique sur la β-lactoglobuline protégent alors l'intégralité structurale de cette protéine, ce qui n'est plus le cas pour les autres sels étudiés.

L'abondante expérimentation réalisée montre qu'en dépit de la différence de leurs structures, la sérum albumine et la β-lactoglobuline fixent l'ac. ascorbique selon des modalités très voisines.

CHAPITRE IV-

STABILITE COMPAREE DE L'ACIDE ASCORBIQUE LIBRE, ET LIE A LA β - LACTOGLOBULINE

Introduction.

Jusqu'à maintenant la fixation de l'acide ascorbique sur la β -lactoglobuline a été effectuée en absence de l'oxygène de l'air et au sein de solutions dépourvues de traces de métaux lourds.

Plusieurs auteurs (63) ont montré que l'acide ascorbique s'oxyde en présence de l'oxygène de l'air et cette oxydation dépend à la fois :
a- De la quantité d'acide ascorbique présente dans la solution.
b- de la quantité d'oxygène qui se trouve dans le milieu.

En d'autres termes l'oxydation est d'autant plus puissante que la quantité d'oxygène est importante.

D'autres auteurs (64, (65), (66), (67), (68), (69), (70), ont montré que des métaux lourds comme : le Fe, Mn, Cr, Cu ... exercent une action catalytique sur cette oxydation, l'importance de celle-ci est en rapport direct avec la quantité de ces métaux présents dans le milieu réactionnel.

Il serait donc intéressant de savoir si l'acide ascorbique fixé sur la β -lactoglobuline s'oxyde aussi rapidement que l'acide ascorbique libre en présence de l'oxygène de l'air et des métaux lourds. Exprimé sous une autre forme, ceci revient à rechercher si les liaisons qui se forment entre la β -lactoglobuline et l'acide ascorbique sont capables de protéger celui-ci contre les agressions de l'environnement oxygéné.

Conditions expérimentales.

Le protocole expérimental de la fixation, utilisé en deuxième et troisième chapitre de ce travail demeure inchangé. L'acide ascorbique et la protéine sont mis en solution aqueuse, et ajustés aux différents pH par une faible quantité de XCl ou NaOH dilué.

Après dialyse, la richesse en acide ascorbique du complexe restant dans le dialyseur est telle qu'une dilution préalable s'avère nécessaire afin de réaliser des concentrations permettant le dosage spectrophotométrique de l'acide ascorbique. Nous avons donc complété à 100 ml le volume du contenu du dialyseur.

La concentration primitive de la β-lactoglobuline passe de ce fait de 0,5 à 0,05 g/litre. En fonction du pH d'obtention du complexe (4,0 - 5,0 - 6,0 et 7,0) le taux d'acide ascorbique par ml de solution de complexe sera respectivement 10,0 - 8,0 - 12,0 et 10,5 µg/ml, il sera tenu compte de ces valeurs dans tout ce qui suit.

CHAPITRE 1-

I-I - Action de l'oxygène de l'air.

Après la fixation de l'acide ascorbique ($2,5 \times 10^{-3}$ M) sur la β-lactoglobuline (0,5 g/l), le contenu du dialyseur est complété à 100 ml et versé dans une fiole conique dont l'ouverture est recouverte d'un tissu de tergal très serré, capable d'arrêter la poussière, mais non pas d'empêcher les échanges gazeux avec l'atmosphère.

On mesure alors spectrophotométriquement à 266 nm, la quantité d'acide ascorbique disparu en fonction du temps.

Résultats.

La figure 75 montre qu'à la température ambiante, l'oxygène de l'air oxyde complètement l'acide ascorbique libre au bout de 9 heures.

- Dans le cas du complexe acide ascorbique + β-lactoglobuline, l'oxydation porte seulement sur une partie de l'acide ascorbique, l'autre partie reste rlativement stable au cours des heures qui suivent. Le processus d'oxydation est toujours fonction du pH.

A pH 4,0 et 7,0, le complexe ascorbique est très stable vis à vis de l'oxygène de l'air ; en d'autres termes la β-lactoglobuline protège le ligand vitaminique.

A pH 5,0 et 6,0, la protéine s'avère incapable de protéger complètement la totalité de la vitamine C complexée L'oxydation est d'autant plus importante que la quantité de vitamine C fixée est elle même importante.

Les modalités de fixation de l'acide ascorbique sont donc différentes selon la valeur du pH.

CHAPITRE 1-

I-I - Action de l'oxygène de l'air.

Après la fixation de l'acide ascorbique ($2,5 \times 10^{-3}$ M) sur la β-lactoglobuline (0,5 g/l), le contenu du dialyseur est complété à 100 ml et versé dans une fiole conique dont l'ouverture est recouverte d'un tissu de tergal très serré, capable d'arrêter la poussière, mais non pas d'empêcher les échanges gazeux avec l'atmosphère.

On mesure alors spectrophotométriquement à 266 nm, la quantité d'acide ascorbique disparu en fonction du temps.

Résultats.

La figure 75 montre qu'à la température ambiante, l'oxygène de l'air oxyde complètement l'acide ascorbique libre au bout de 9 heures.

- Dans le cas du complexe acide ascorbique + β-lactoglobuline, l'oxydation porte seulement sur une partie de l'acide ascorbique, l'autre partie reste rlativement stable au cours des heures qui suivent. Le processus d'oxydation est toujours fonction du pH.

A pH 4,0 et 7,0, le complexe ascorbique est très stable vis à vis de l'oxygène de l'air ; en d'autres termes la β-lactoglobuline protège le ligand vitaminique.

A pH 5,0 et 6,0, la protéine s'avère incapable de protéger complètement la totalité de la vitamine C complexée L'oxydation est d'autant plus importante que la quantité de vitamine C fixée est elle même importante.

Les modalités de fixation de l'acide ascorbique sont donc différentes selon la valeur du pH.

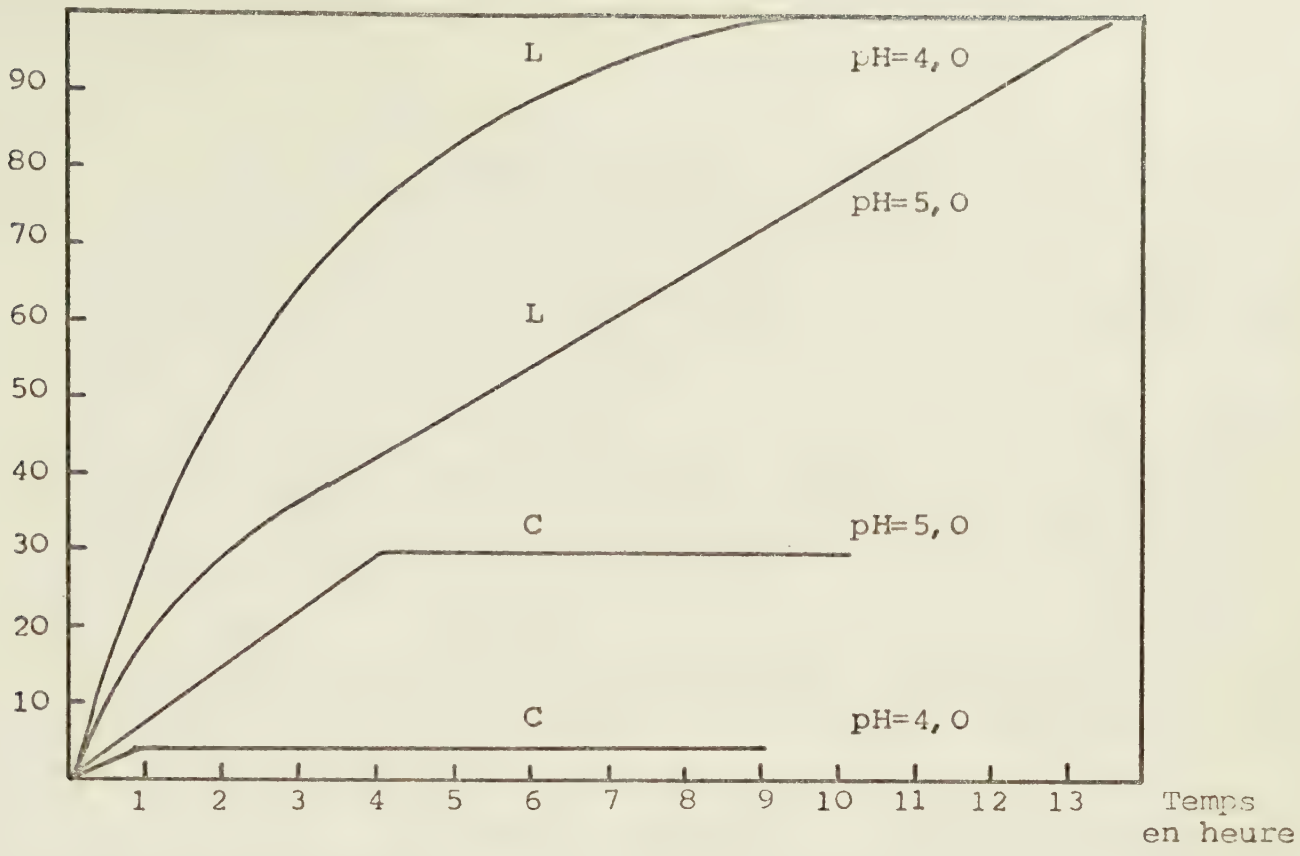
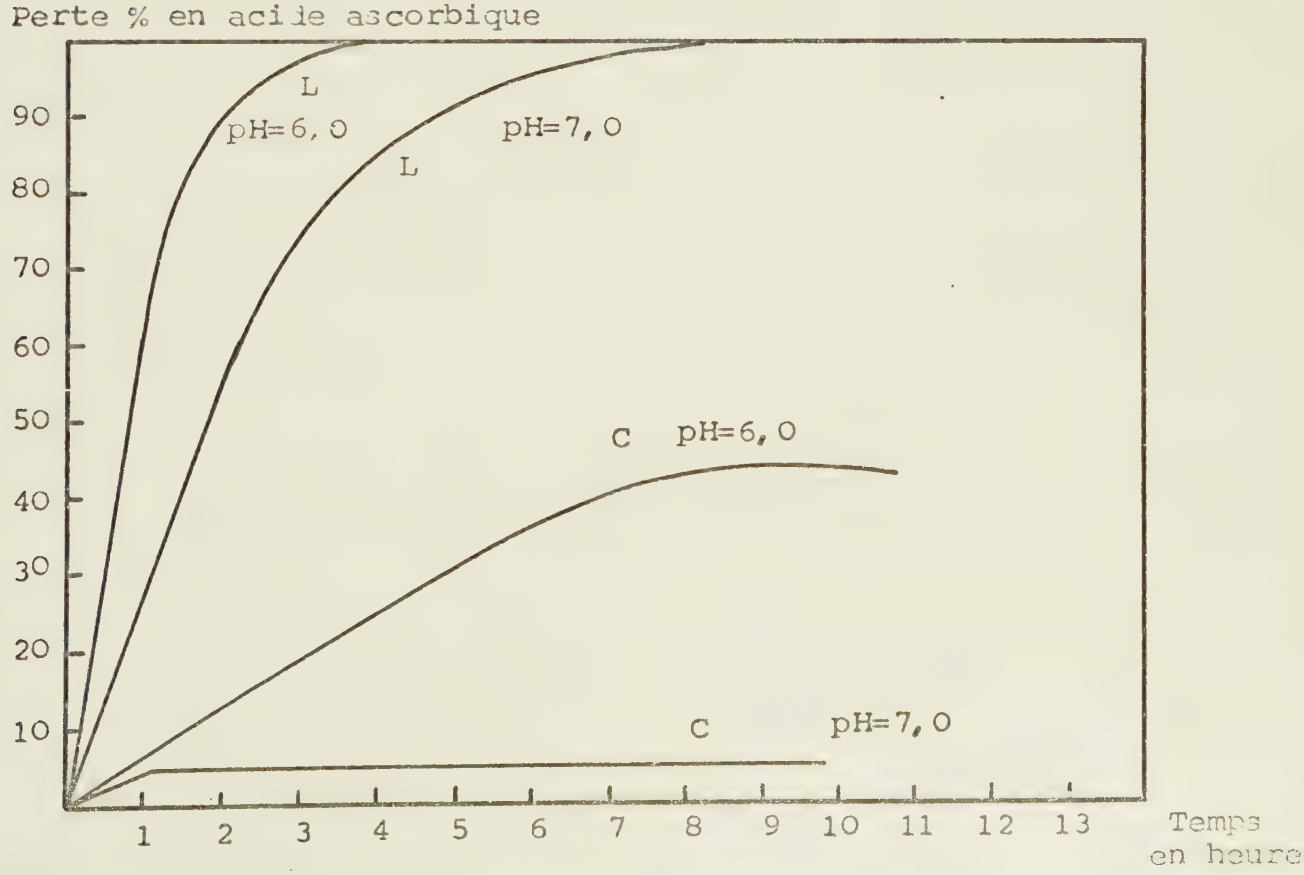


Figure 75- Pourcentage comparé de destruction à l'air de l'acide ascorbique libre et complexé en fonction du pH et du temps.
L = acide ascorbique libre C = acide ascorbique complexé



Schématiquement, à pH 4,0 et 7,0, les liaisons qui s'établissent entre la β-lactoglobuline et le ligand ascorbique mettent globalement en jeu une énergie qui réussit à inhiber ou tout au moins à ralentir considérablement le processus d'oxydation de toutes les molécules vitaminiques fixées.

A pH 5,0 et 6,0, il existerait deux types de liaisons. Les unes seraient similaires à celles qui apparaissent à pH = 4,0 et 7,0. Leur présence expliquerait la résistance à l'oxydation d'une partie de l'acide ascorbique fixé.

Les autres liaisons qui sont certainement d'un niveau énergétique plus faible seraient de ce fait incapables de protéger efficacement l'acide ascorbique contre l'oxydation.

Il est intéressant d'établir un rapprochement entre les actuels résultats et le fait qu'à pH 6,0 l'amplitude de l'extrêmum négatif de l'effet Cotton du complexe ascorbique manifeste le plus grand développement.

Nous avons précédemment supposé qu'un tel accroissement pouvait traduire une certaine organition des molécules de ligand autour de la β-lactoglobuline.

A la lumière des présents résultats, on pourrait supposer que les molécules d'acide ascorbique participant à cette "structuration externe" sont plus directement vulnérables à l'oxydation. Si l'on adopte ce point de vue, la figure 75 indiquerait que 43% de l'acide ascorbique fixé se trouvent impliqués dans une telle structuration.

De toutes façons et quelles que soient les conditions expérimentales, l'acide ascorbique libre est détruit bien plus rapidement que l'acide ascorbique complexé.

III - Action catalytique du fer.

Non seulement tous les tissus vivants

renfermant du fer, mais encore ils sont industriellement traités dans un appareillage (broyeurs, malaxeurs etc...) fait de ce métal.

Le fer est donc l'oligo-élément que l'on peut considérer comme omniprésent à des doses non négligeables, et nous avons déjà rappelé son rôle catalytique dans l'oxydation de l'acide ascorbique . Il est donc intéressant d'étudier si sa présence diminue la résistance à l'oxydation de l'acide ascorbique complexé.

Conditions expérimentales.

- Après obtention d'un complexe ascorbique, et afin de se placer dans les conditions les plus défavorables pour la stabilité de l'acide ascorbique, nous avons dilué dix fois le volume de sa solution avant d'y ajouter des traces de fer.

Celles-ci ont été ajoutées sous forme de sulfate ferriques à dose de 0,04 - 0,2 - 0,4 et 2,0 µg Fe / ml.

A titre de comparaison, on a aussi étudier la destruction de l'acide ascorbique libre dans les mêmes conditions de pH et de concentrations en fer.

- Le pourcentage de perte en acide ascorbique en présence de fer est mesurée en fonction du temps.

Résultats.

Selon les figures 76, 77, 78 et 79,

- Pour une concentration donnée en fer, le pourcentage de perte en acide ascorbique en fonction du temps, varie suivant la valeur du pH, il est maximum à pH = 5,0 et 6,0 et minimum à pH = 4,0 et 7,0.

- Pour un pH et un temps donnés, le pourcentage de perte augmente avec la concentration en fer.

- Notons qu'en milieu aéré et en présence de fer la plus rapide destruction de l'acide ascorbique complexé à la

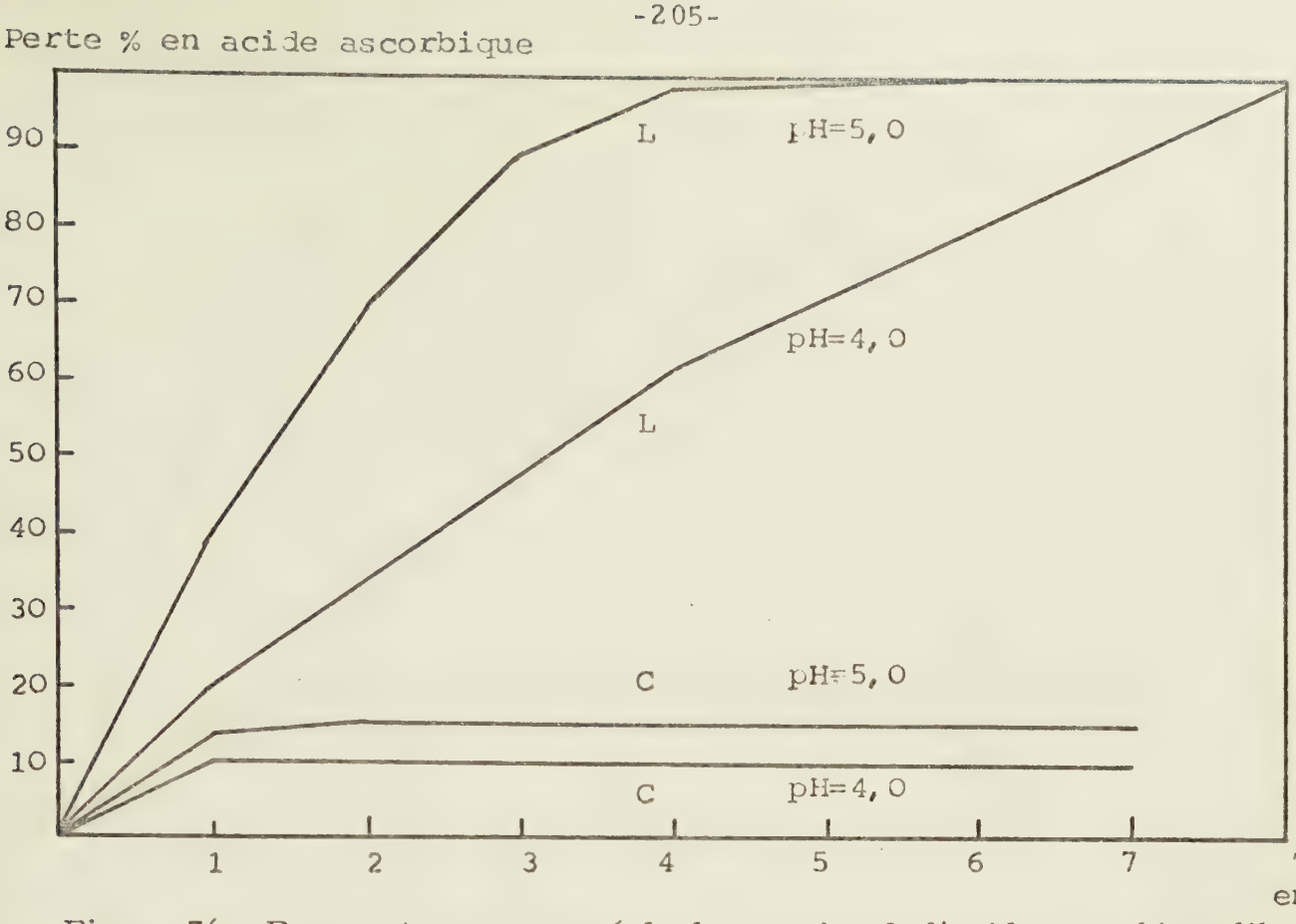
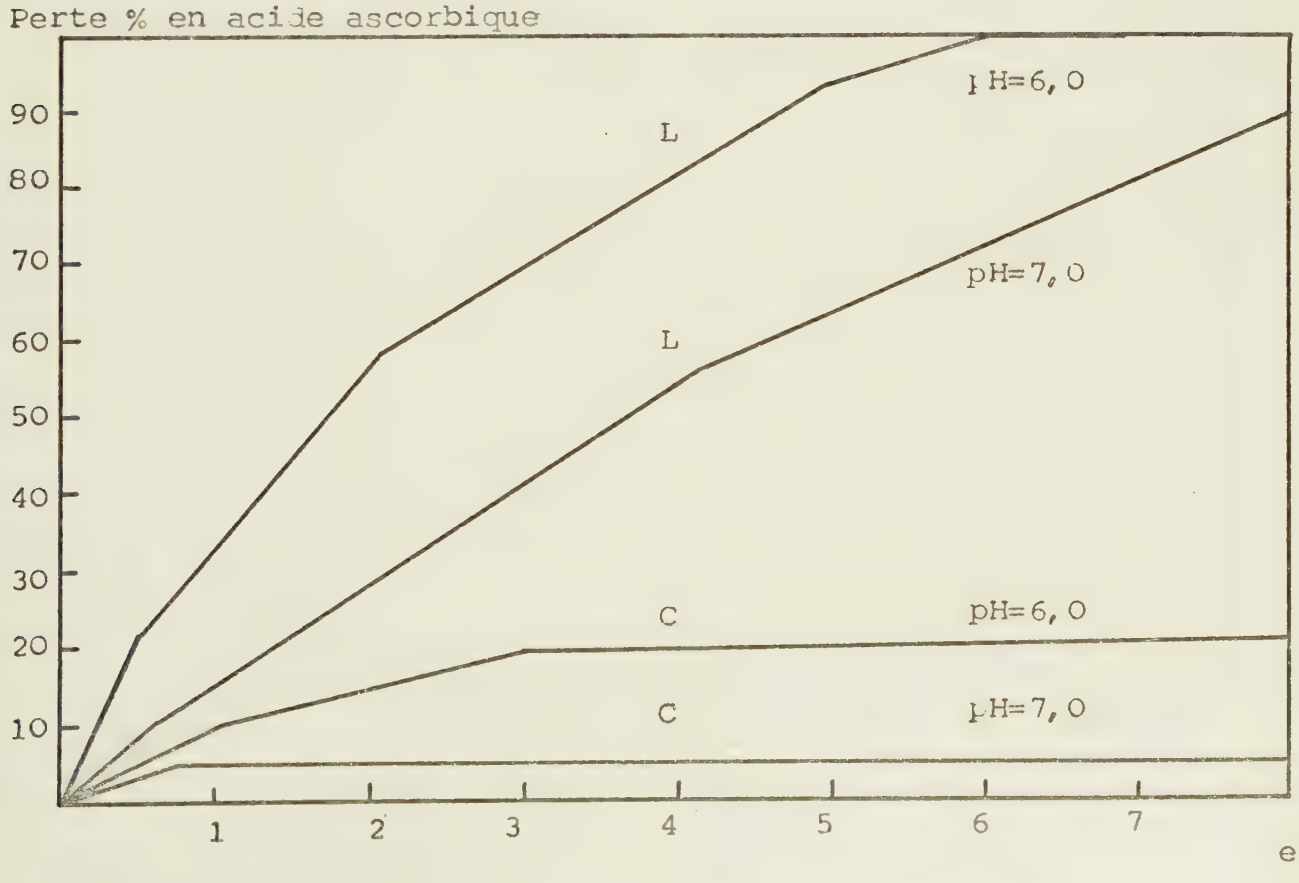


Figure 76 - Pourcentage comparé de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Fe (0, 04 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



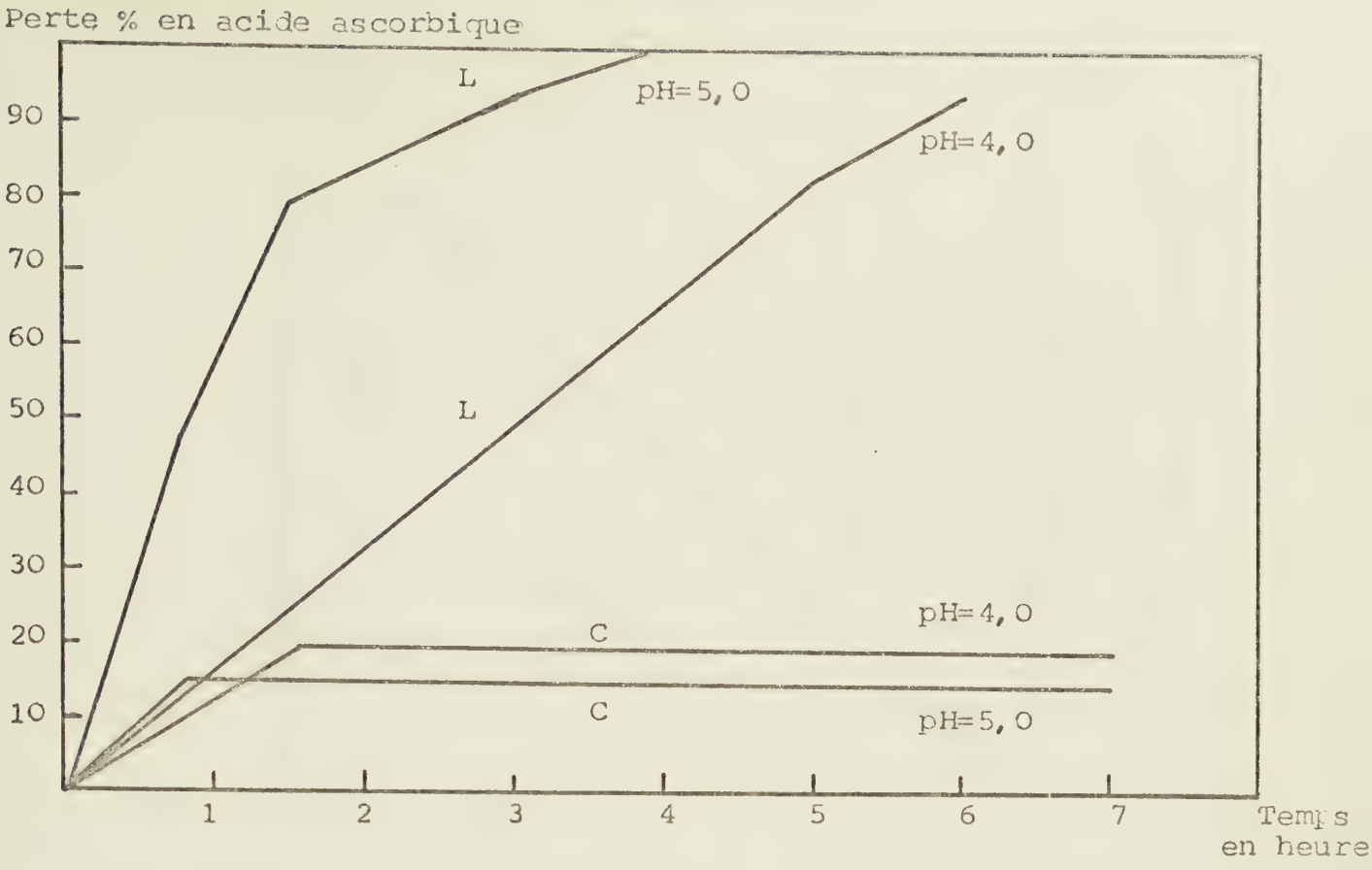
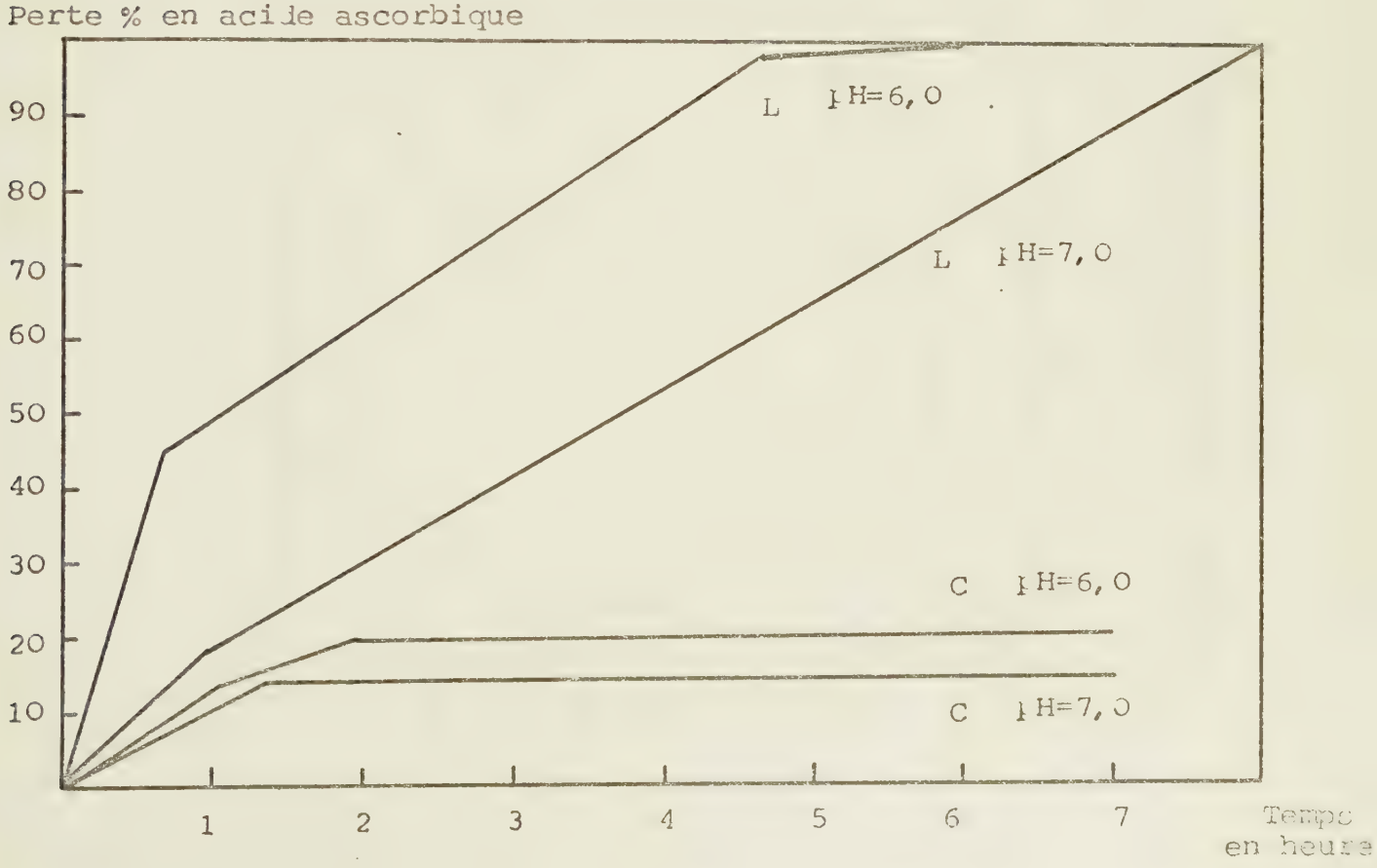
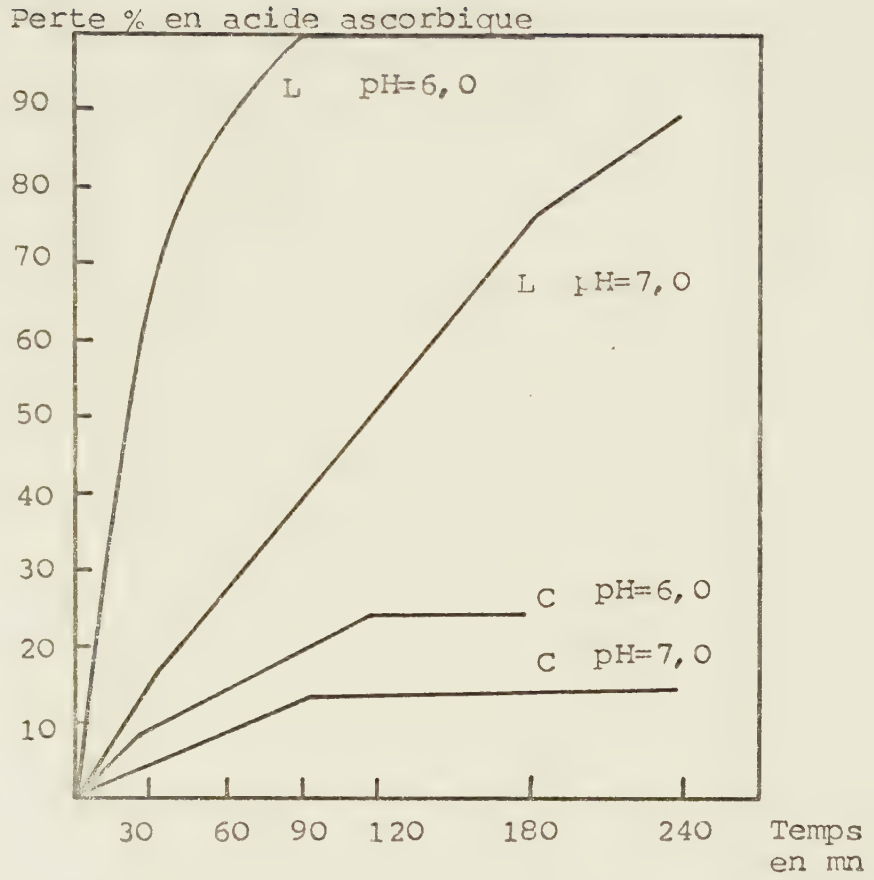


Figure 77- Pourcentage comparé de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Fe (0,2 µg/ml) en fonction du pH et du temps.





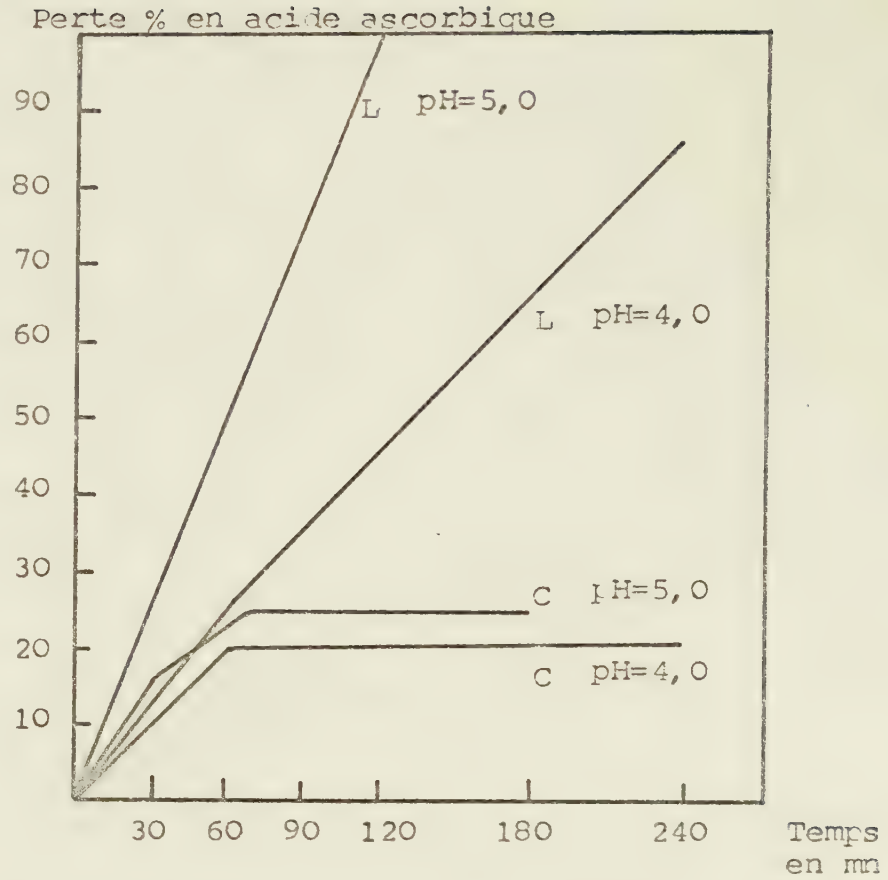
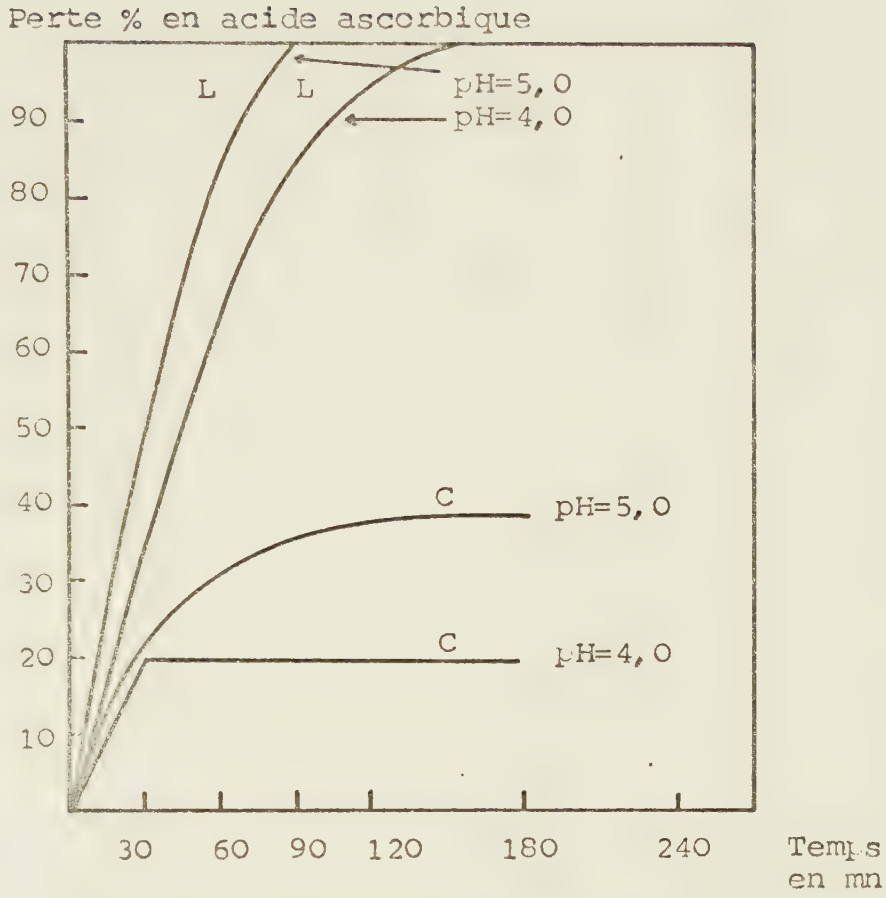


Figure 78 - Pourcentage comparé de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Fe (0,4 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



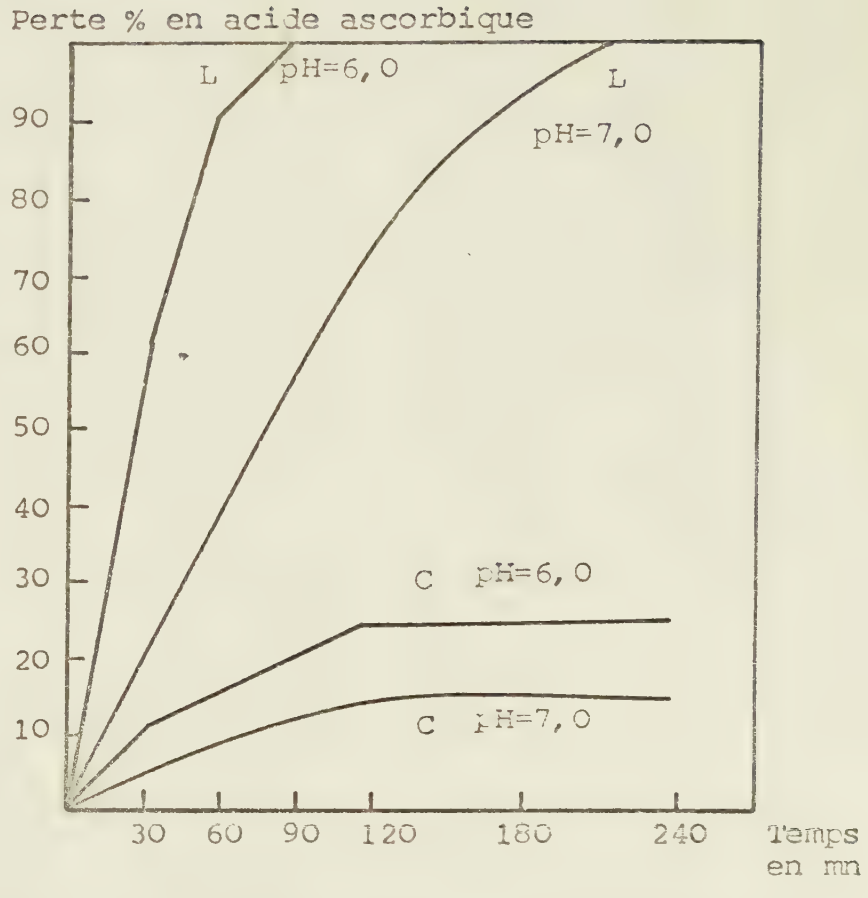


Figure 79 - Pourcentage comparé de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Fe (2,0 µg/ml) en fonction du pH et du temps.

protéine s'effectue à pH 5,0, alors qu'en l'absence de traces métalliques c'est à pH 6,0 que l'oxydation est la plus rapide.

- A pH 5,0, le pourcentage de destruction de l'acide ascorbique complexé est de 40% en trois heures et en présence de Fe (2 µg/ml) alors qu'il n'est que de 24% dans les mêmes conditions mais en l'absence de traces de cet élément.

- On en déduit qu'en présence de traces de fer, l'acide ascorbique complexé à la β-lactoglobuline résiste mieux à l'oxydation que l'acide ascorbique libre. Toutefois l'altération de l'acide ascorbique complexé est plus rapide en présence qu'en l'absence de traces de fer.

IV- Le manganèse.

- Tous les aliments naturels renferment du manganèse, mais dans les matières alimentaires traitées industriellement, il est éventuellement possible de rencontrer des traces de cet élément provenant de l'usure des aciers spéciaux composant l'appareillage utilisé à cette fin.

Enfin dans les aliments composés destinés aux animaux l'élevage, le manganèse sous forme de sel se trouve inclus au condiment minéral.

- Conditions expérimentales.

L'expérimentation est réalisée comme dans le cas du fer. Le manganèse est apporté sous forme de sulfate. Les concentrations étudiées sont 0,04 - 0,2 - 0,4 et 2,0 µg Mn/ml.

Résultats.

Les résultats sont groupés dans les figures 80, 81 et 82.
Ils montrent que :

- pendant un temps déterminé et pour toutes les valeurs de pH étudiées, le pourcentage de destruction de l'acide ascorbique augmente à mesureque croît la concentration

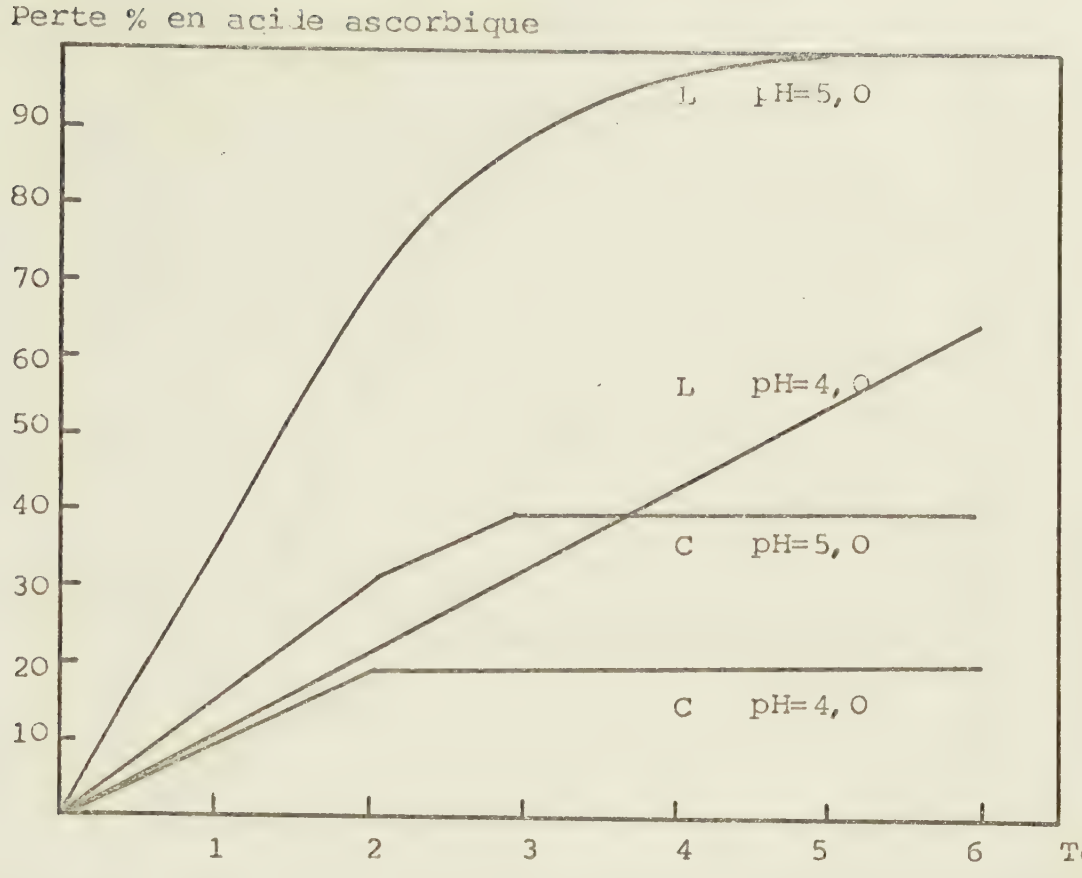
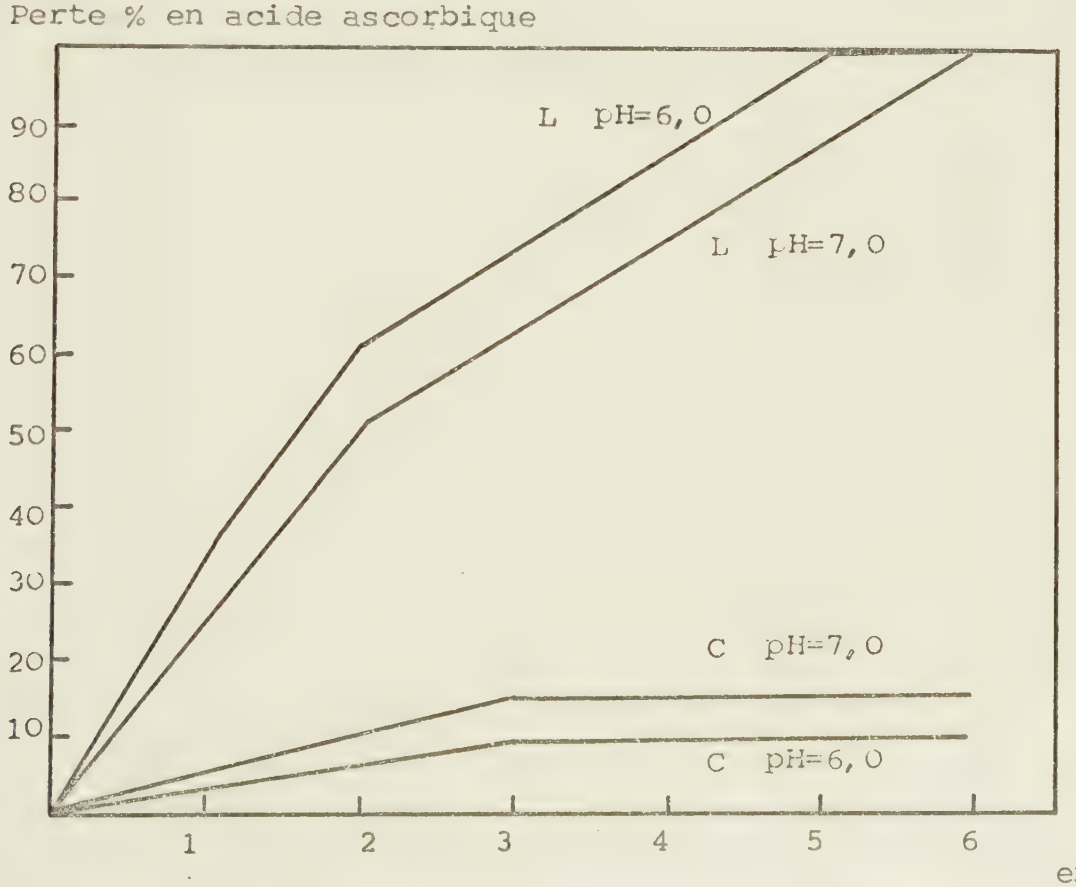


Figure 80- Pourcentage comparé de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Mn (0,04 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



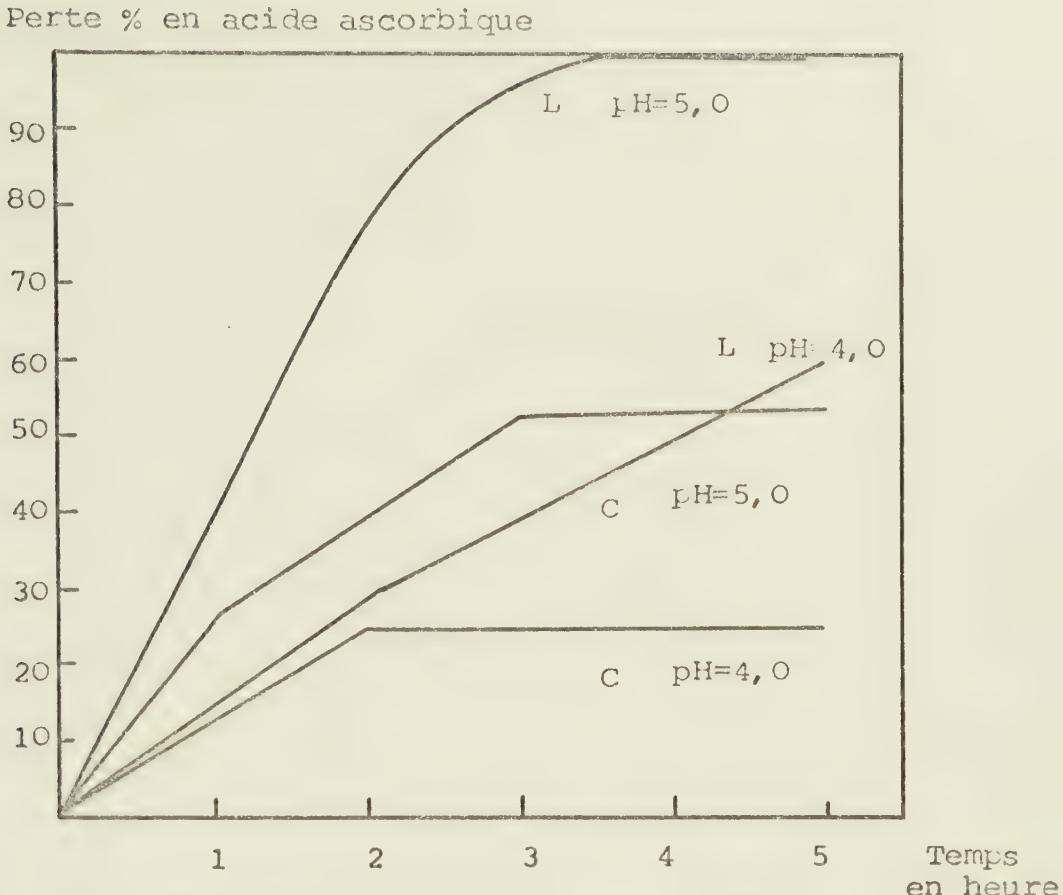
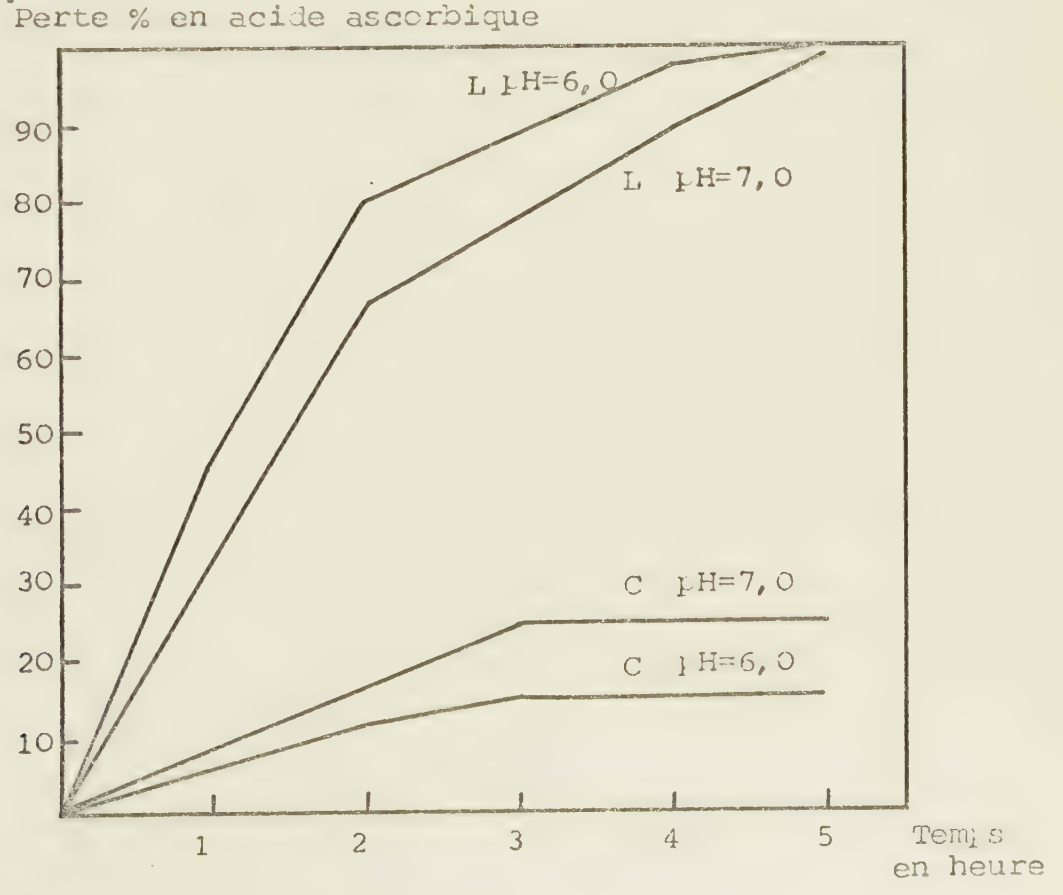


Figure 81 - Pourcentage comparé de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Mn (0,2 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



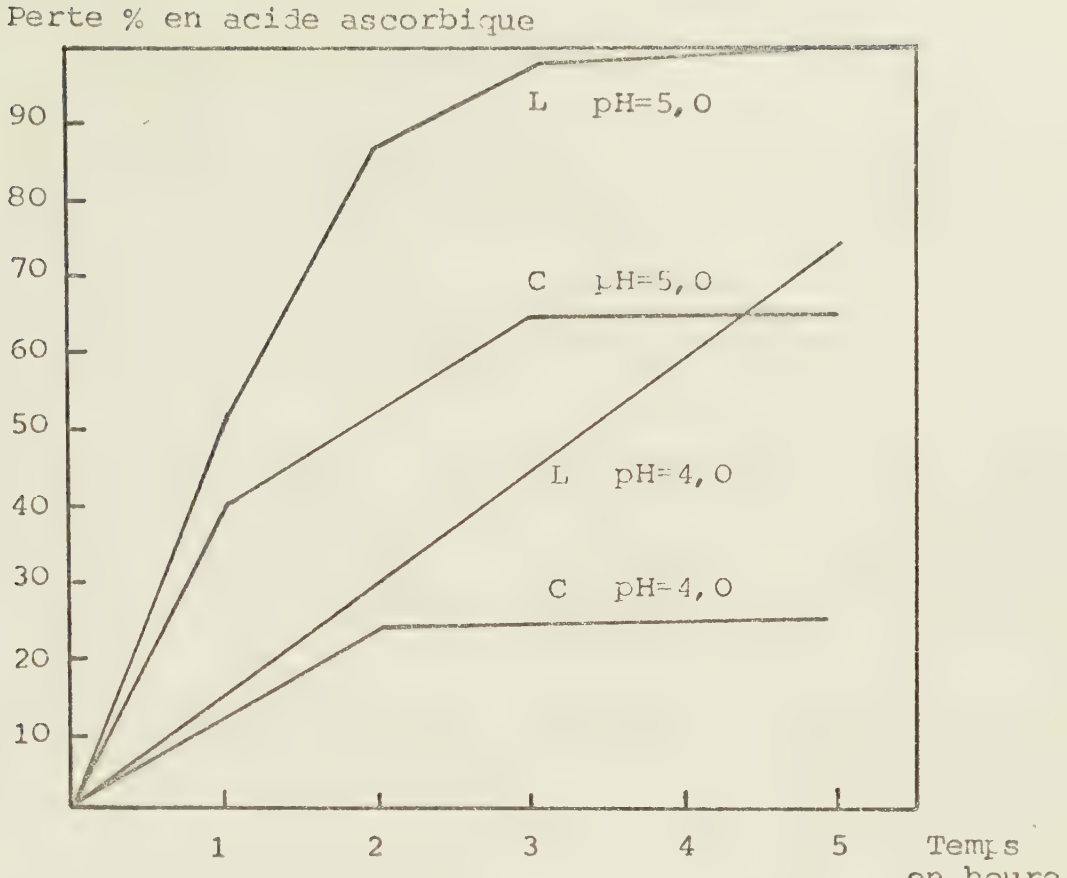
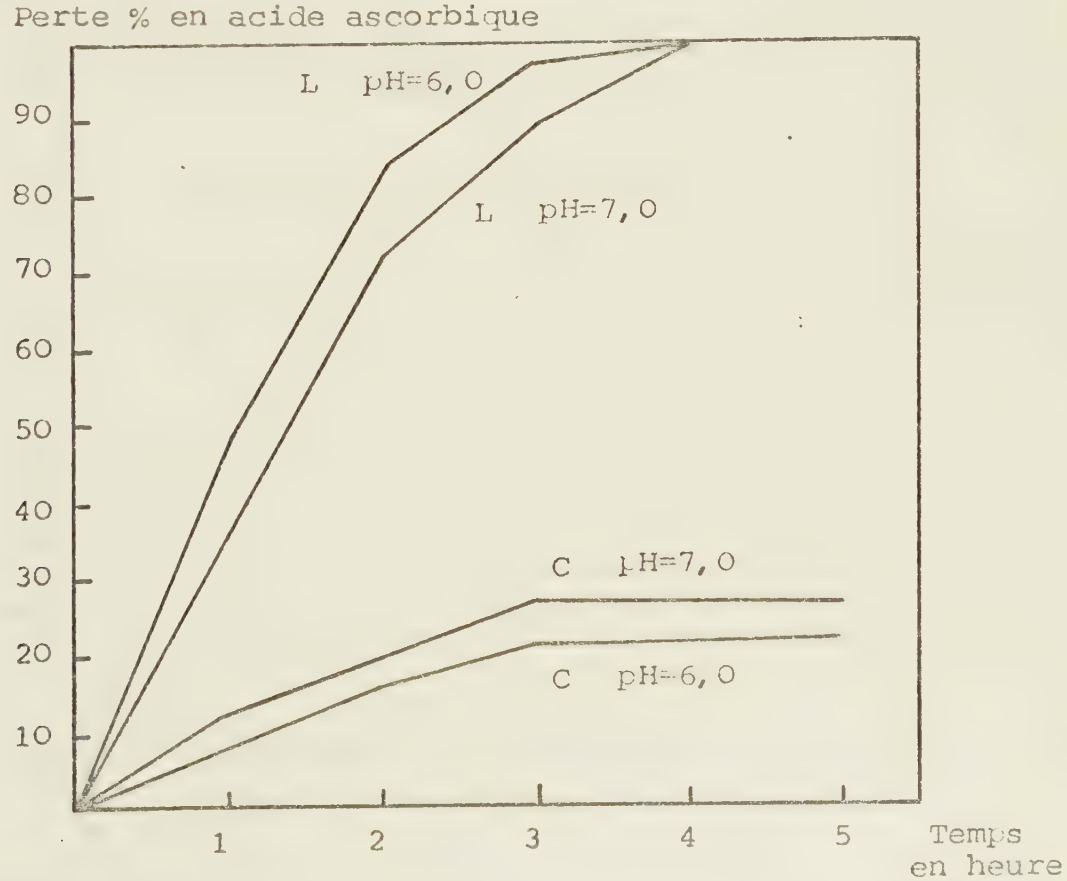


Figure 82 - Pourcentage comparé de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Mn (0,4 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



en Mn, et jusqu'à ce que cette dernière ait atteint 0,4 µg/ml. Au delà de ce seuil une élévation du taux de Mn n'accélère pas la destruction de l'acide ascorbique fixé sur la β-lactoglobuline.

- Pour une concentration donnée de Mn, le pourcentage de perte varie avec le pH. Comme dans le cas de Fe, il est maximum à pH 5,0.

- Dans la limite des concentrations utilisées, la présence de Mn favorise la destruction de l'acide ascorbique mais celle-ci est plus limitée lorsque l'acide est préalablement complexé. Les courbes montrent que la destruction de l'acide en présence de Mn revêt comme en présence de Fe, un aspect biphasique.

- La stabilité de l'acide ascorbique complexé est cependant plus grande en l'absence de Mn qu'en présence de traces de cet élément.

V - Le chrôme.

Pour les mêmes raisons que celles invoquées dans le cas de Mn, des traces de chrôme peuvent se rencontrer dans les aliments traités industriellement. Elles peuvent provoquer des effets similaires à ceux de Fe et Mn ainsi que nous allons le constater.

- Conditions expérimentales.

Le chrôme a été ajouté aux milieux expérimentaux sous forme de sulfate et l'expérimentation conduite en présence de cet élément aux concentrations de 0,04 - 0,2 - 0,4 - et 2,0 µgCr/ml.

Résultats.

Les résultats figures (83- 84 - 85 - 86) sont analogues à ceux trouvés dans le cas de Fe, car dans la limite des concentrations étudiées, on n'a pas rencontré de seuil au delà duquel l'augmentation de la concentration n'accroît plus la vitesse de destruction de l'acide ascorbique.

- A pH 5,0 et à même concentration, la présence de

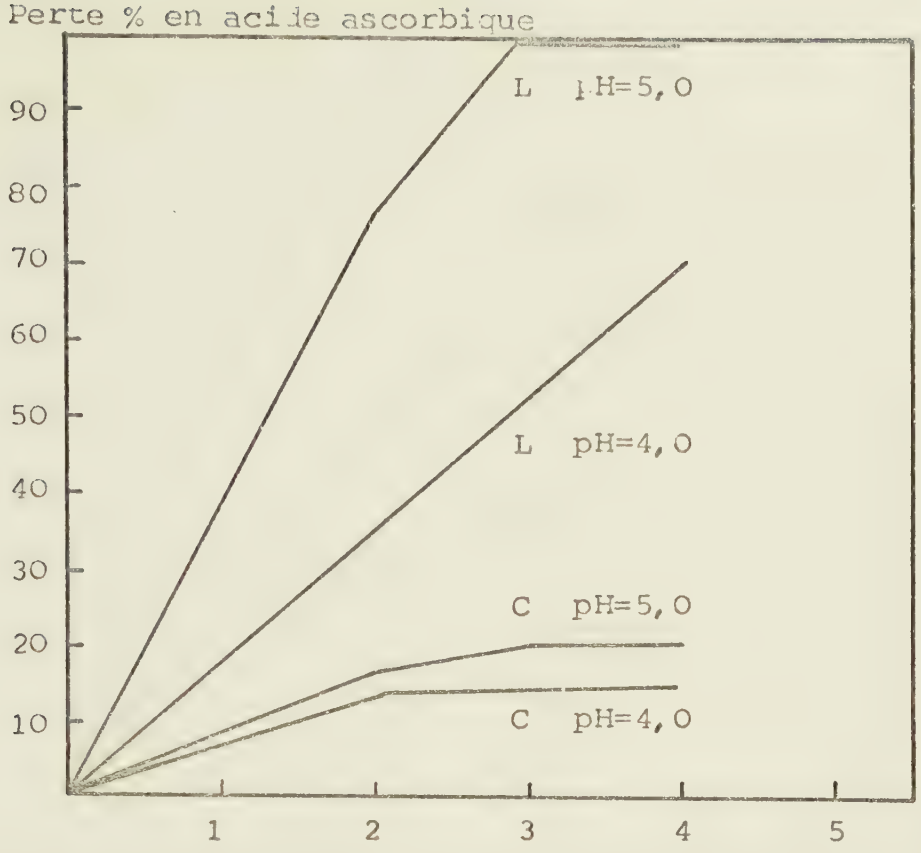
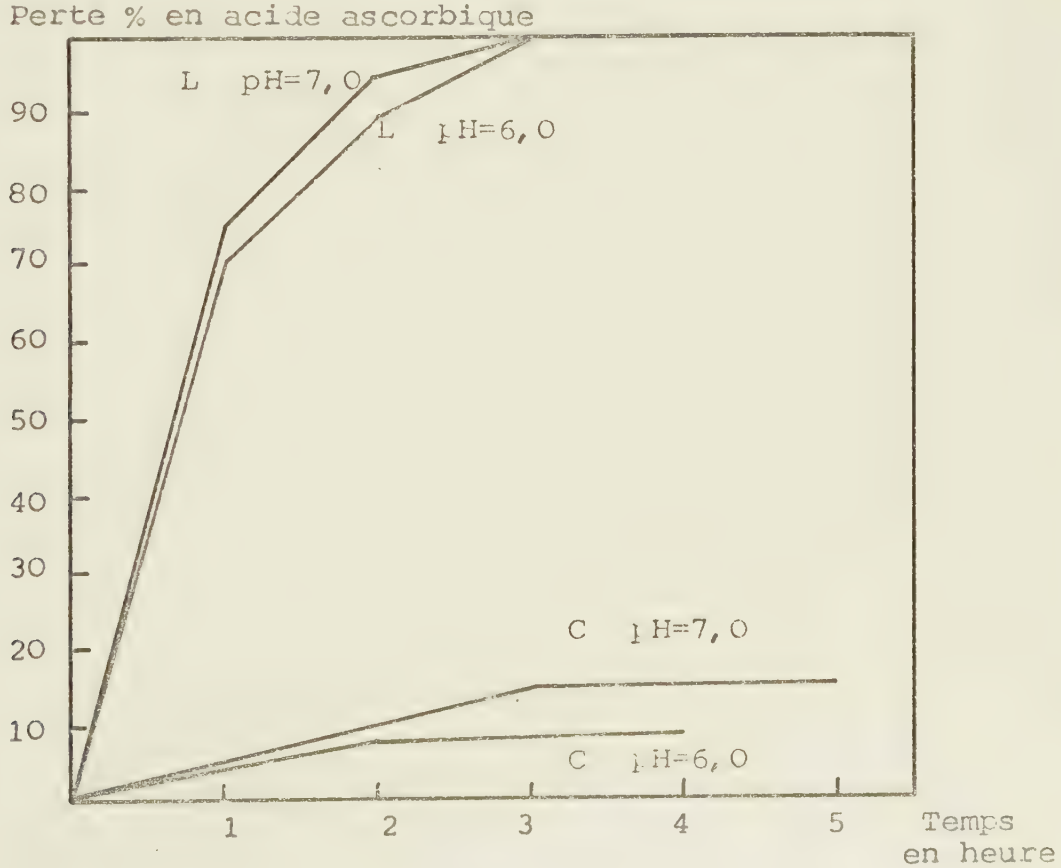


Figure 83 - Pourcentage comparé de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Cr (0,04 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



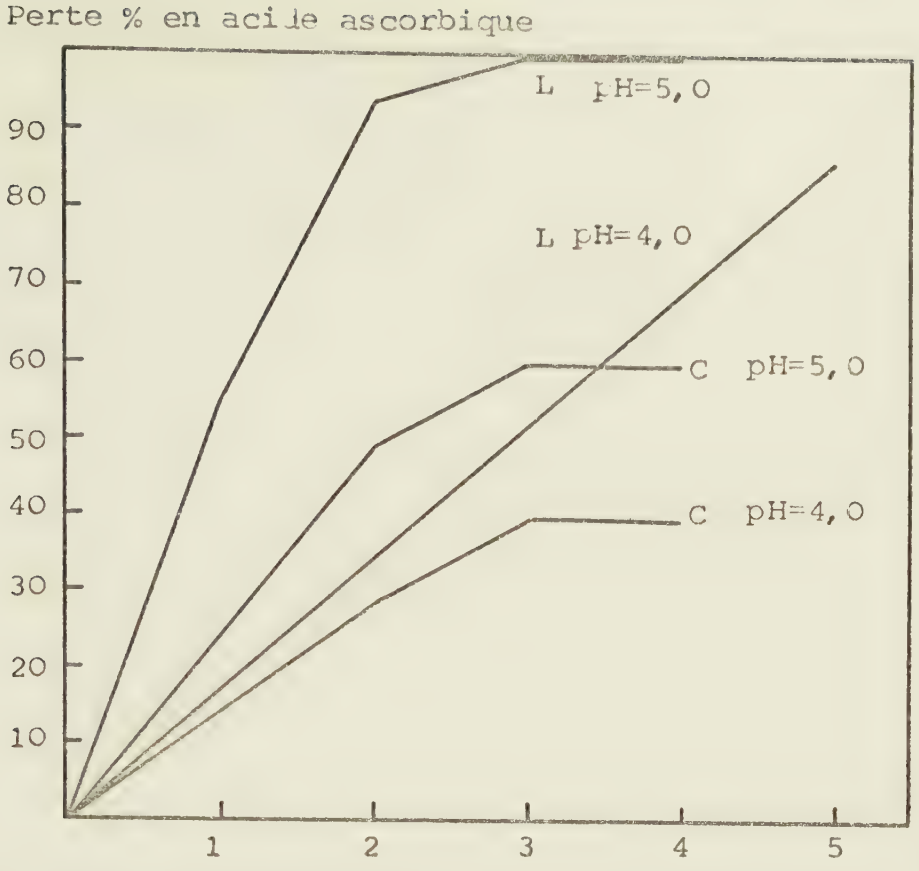
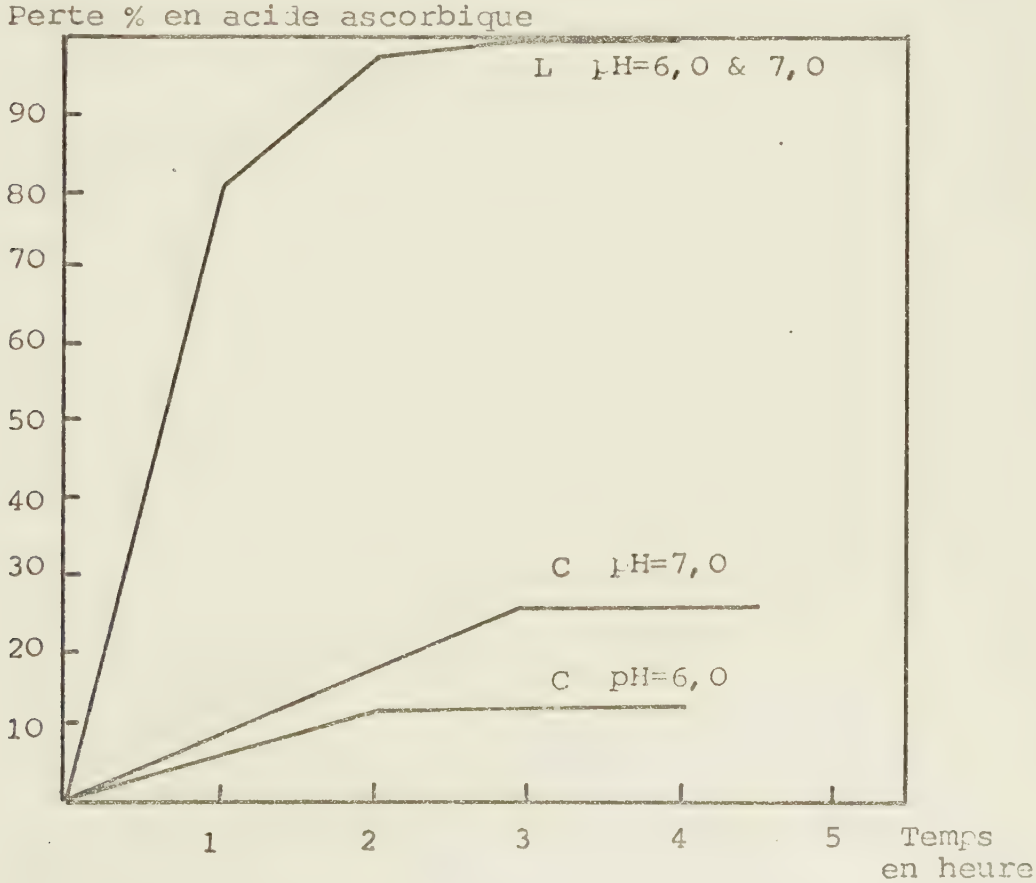


Figure 84 - Pourcentage comparé de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Cr (0,2 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



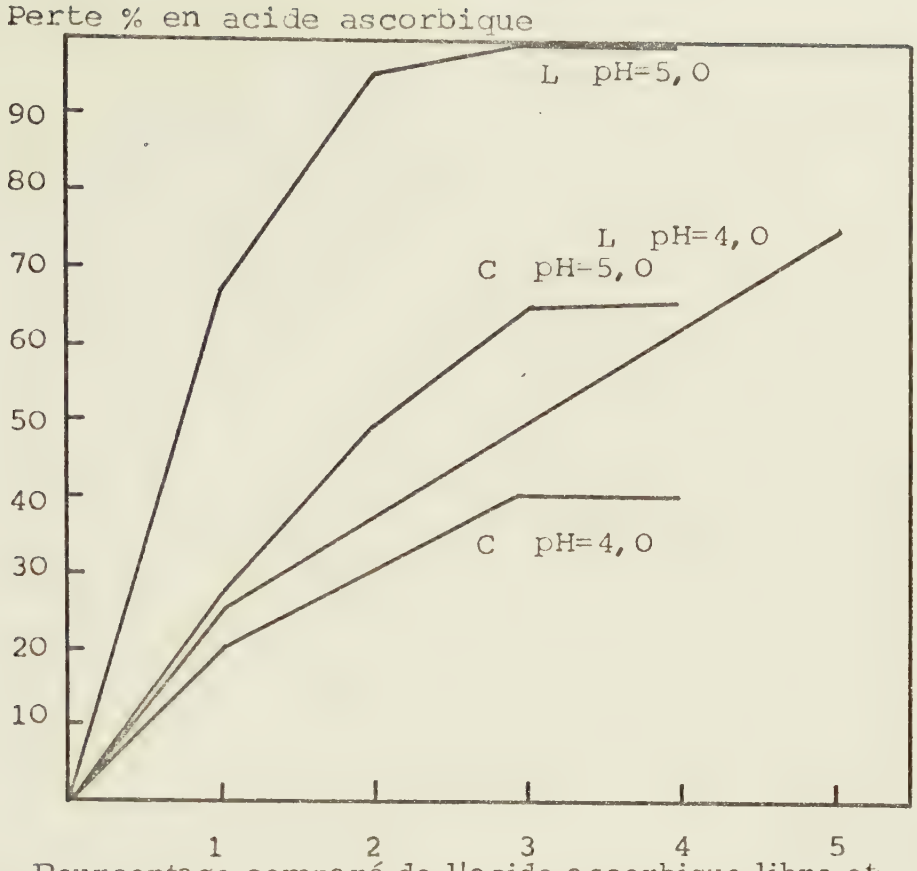
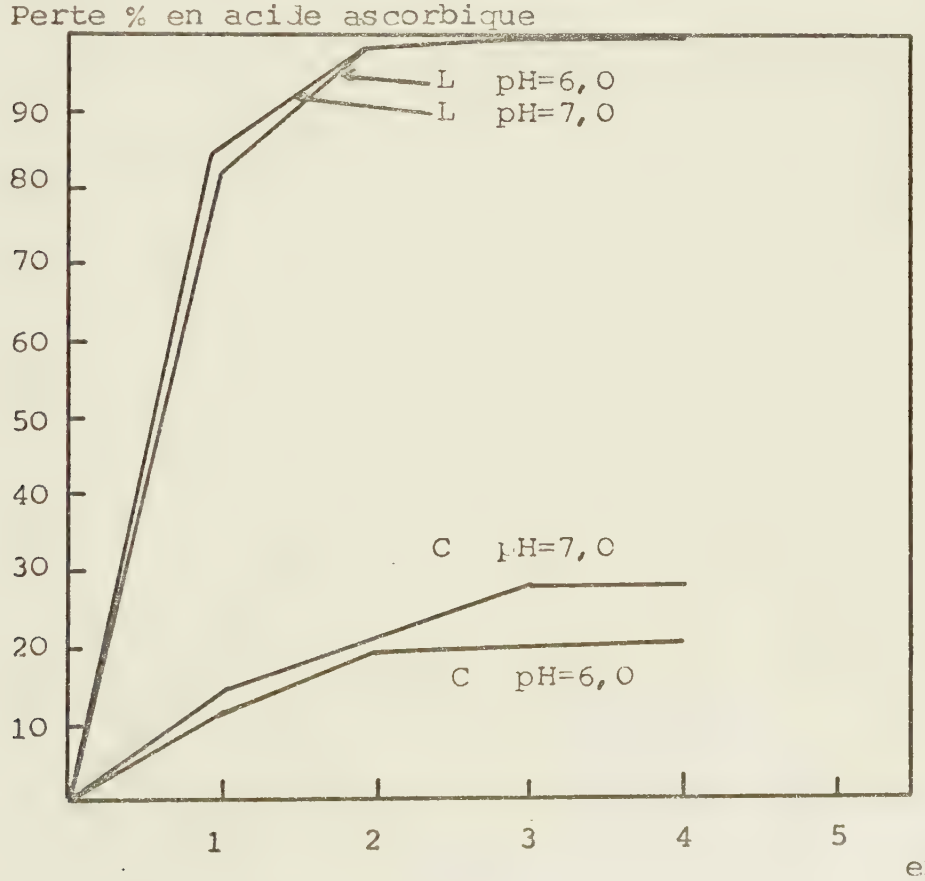


Figure 85 - Pourcentage comparé de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Cr (0,4 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



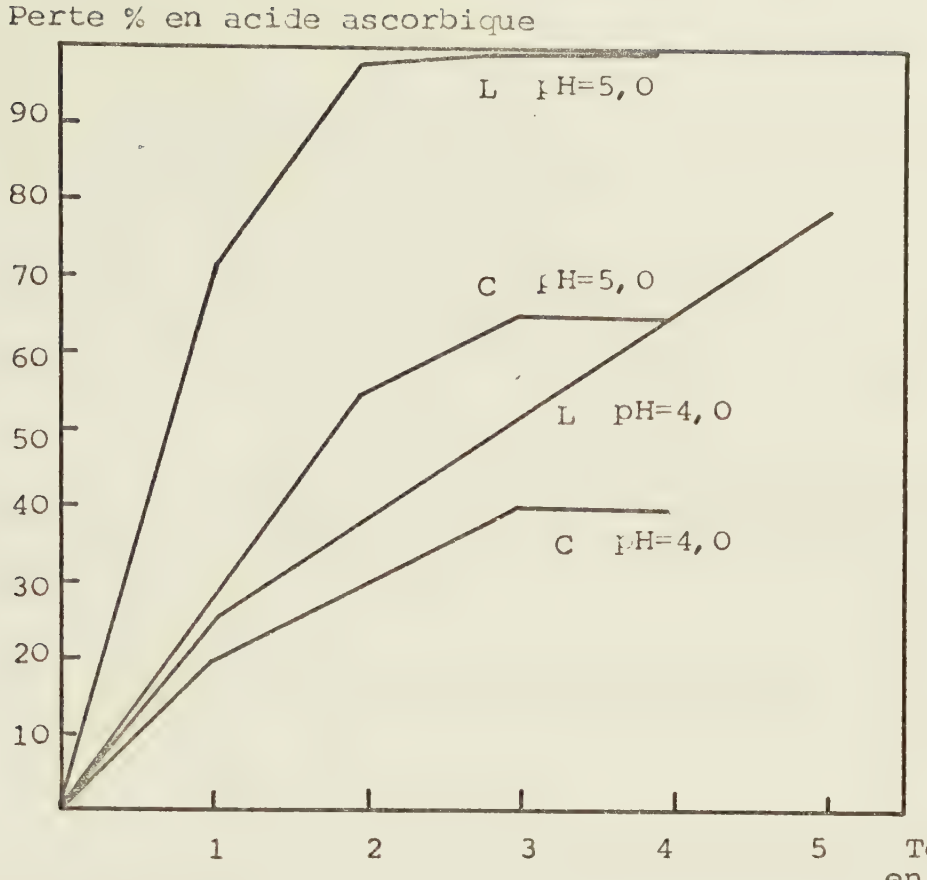
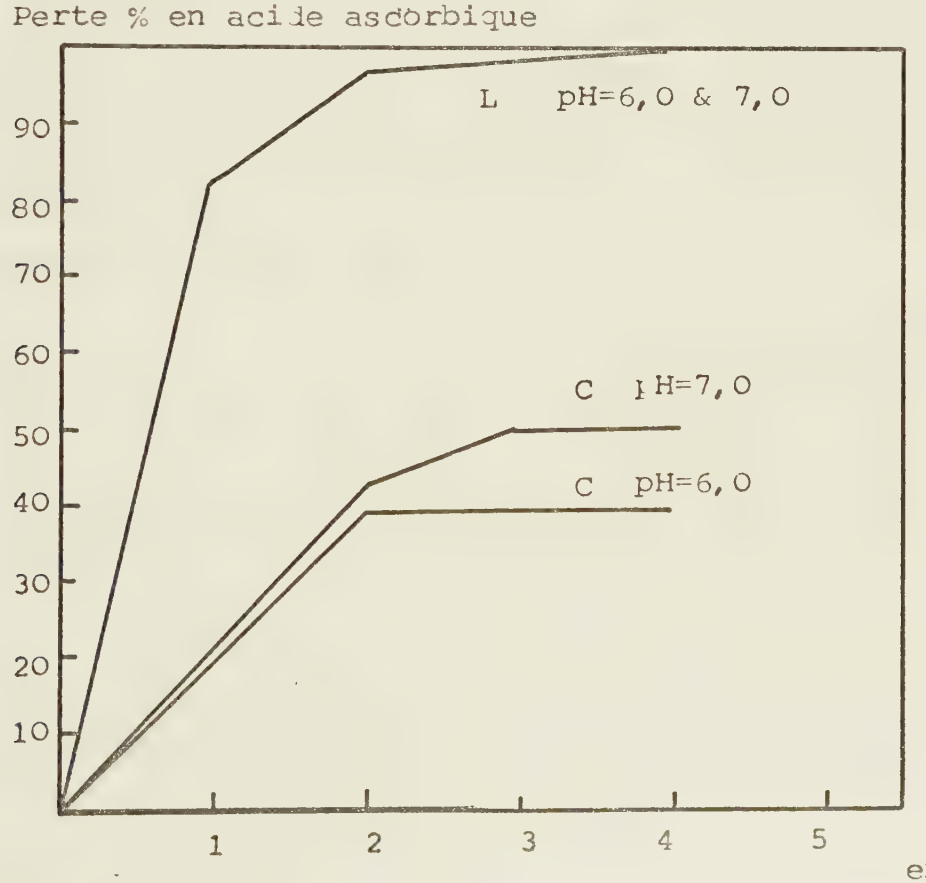


Figure 86 - Pourcentage comparé de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Cr (2,0 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



chrôme se traduit par une agressivité maximale nettement supérieure à celle de Fe, et du même ordre de grandeur que celle du manganèse.

- En présence de chrôme, l'acide ascorbique libre est plus instable qu'en présence de la même concentration de Fe, et ceci quel que soit le pH. L'augmentation de l'agressivité des cations se situe selon : Cr > Fe > Mn.

Lorsqu'il s'agit d'acide ascorbique complexé à la β-lactoglobuline cet ordre peut se trouver modifié en fonction du pH, mais c'est toujours Cr qui provoque la destruction la plus rapide du ligand vitaminique.

- A pH 7,0 par exemple l'activité destructrice des trois cations se situe dans l'ordre: Cr > Mn > Fe.

VI - Le cuivre.

Comme les oligo-éléments précédents, le cuivre se trouve normalement présent dans tous les tissus animaux et végétaux. Des traces additionnelles peuvent provenir des traitements industriels (robinetterie, portions de cuves etc...). Le cuivre est réputé pour être l'élément le plus rapidement destructeur de l'acide ascorbique. En sa présence d'après OGATA, KOSUGI et MORIMOTO, (70), le processus d'oxydation commence par la transformation de l'acide ascorbique en acide dehydroascorbique (DA) selon :

$$H_2A \longleftrightarrow H^+ + HA^- \quad \text{et}$$

$$HA^- + Cu\,(II) \longleftrightarrow [HA\,Cu\,(II)^-] \xrightarrow{\text{réaction lente}} HA^-$$

ou

$$HA^- + Cu\,(II) + O_2 \longleftrightarrow [HA\,Cu\,(II)O_2] \longrightarrow HA^-$$

Le produit final (DA) peut être formé à partir de $HA^\cdot$ et A^- (radical-anion). Le résultat est H_2O_2 qui réagit avec l'acide ascorbique pour donner DA.

- Conditions expérimentales.

L'expérimentation a été conduite en présence de sulfate de cuivre et la concentration des milieux étudiés étant 0,04 - 0,2 - 0,4 et 2,0 µgCu/ ml.

Résultats.

Les résultats que traduisent les figures 87, 88, 89 et 90 mettent en évidence que :

- pour une même valeur du pH et pendant un même temps, le pourcentage de perte en acide ascorbique augmente avec la concentration en cuivre.

- A la différence de ce que l'on a noté jusqu'à présent en présence de Fe, Mn et Cr, la vitesse maximale de destruction de l'acide ascorbique fixé se maintient pratiquement de pH 5,0 à pH 7,0.

- En présence d'une concentration de 0,2 µm/ml la perte est 90% après deux heures pour l'acide ascorbique complexé, tandis qu'il suffit de 30 minutes pour que 98% de la vitamine C libre soit détruite.

La complexation de l'acide ascorbique permet donc à cette molécule de mieux résister à l'oxydation en présence de cuivre. Cependant, du fait de la grande activité catalytique de ce cation, la protection apportée par la complexation demeure toujours de courte durée.

- En ce qui concerne le chrôme et le cuivre, les courbes de destructions de l'acide ascorbique sont différentes de celles que l'on obtient avec le Fe et le Mn, on ne retrouve plus la variation biphasique, la disparition de l'acide ascorbique semble obéir à un phénomène plus complexe.

VII - Protection par l'acide citrique.

D'après FUKUDA, MIYAKAWA, UEKI, (71) l'acide citrique stabilise l'oxydation de l'acide ascorbique par le cuivre, car ce dernier est complexé préférentiellement par l'acide citrique.

La question est donc de savoir si l'acide citrique protège le complexe ascorbique contre l'oxydation et si l'agressivité de Cu^{++} vis à vis du complexe ascorbique se trouve limité lorsque l'on ajoute de l'acide

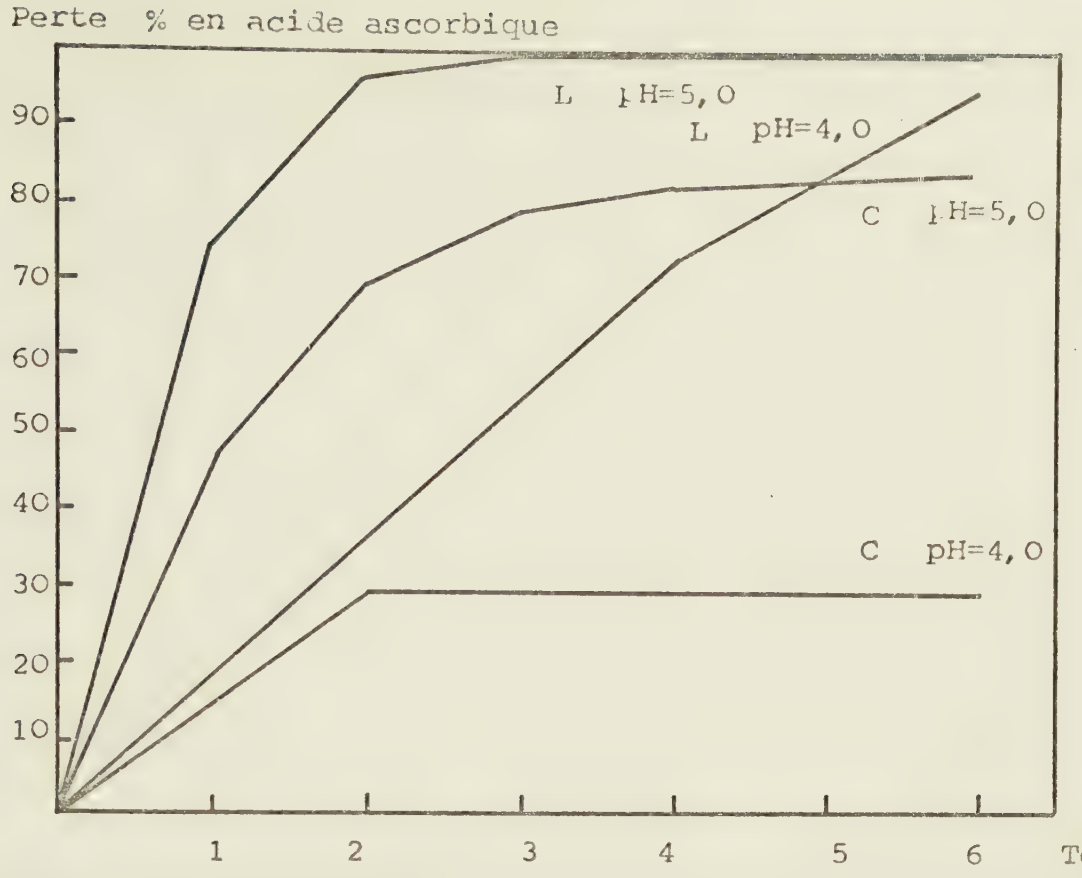
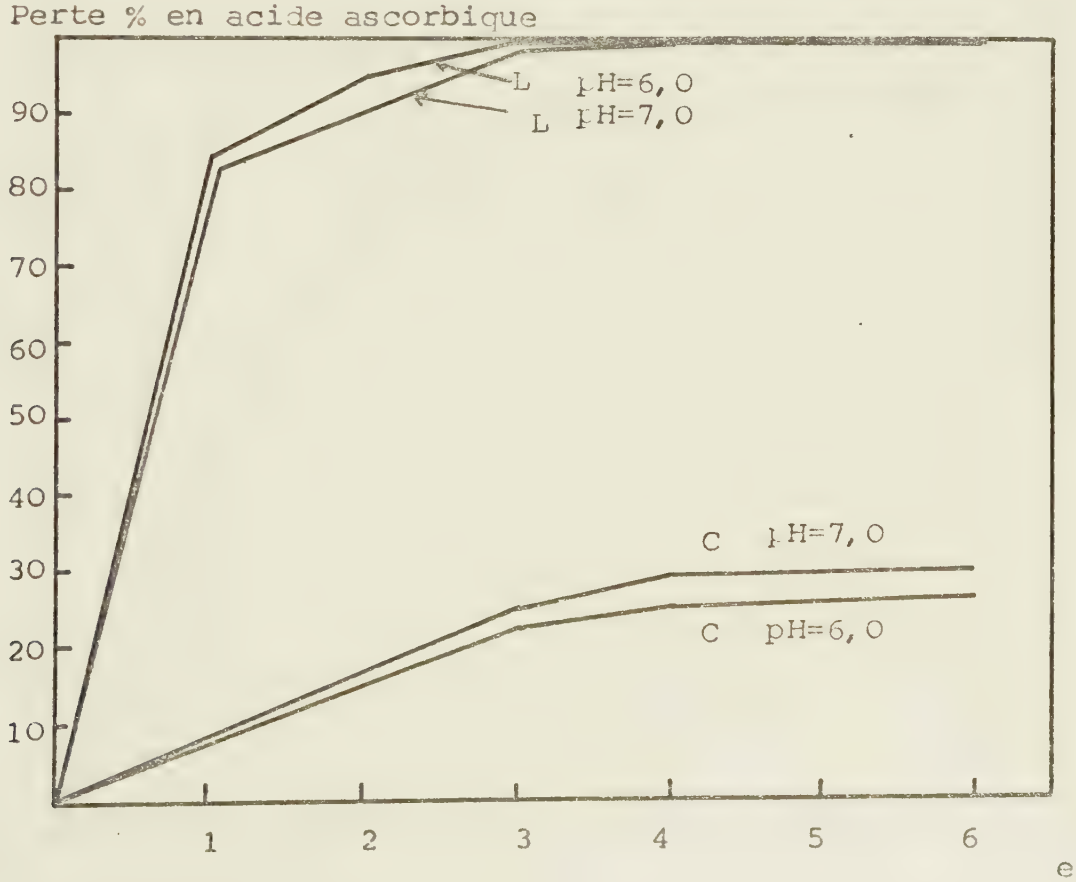


Figure 87 - Pourcentage de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Cu (0, 04 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



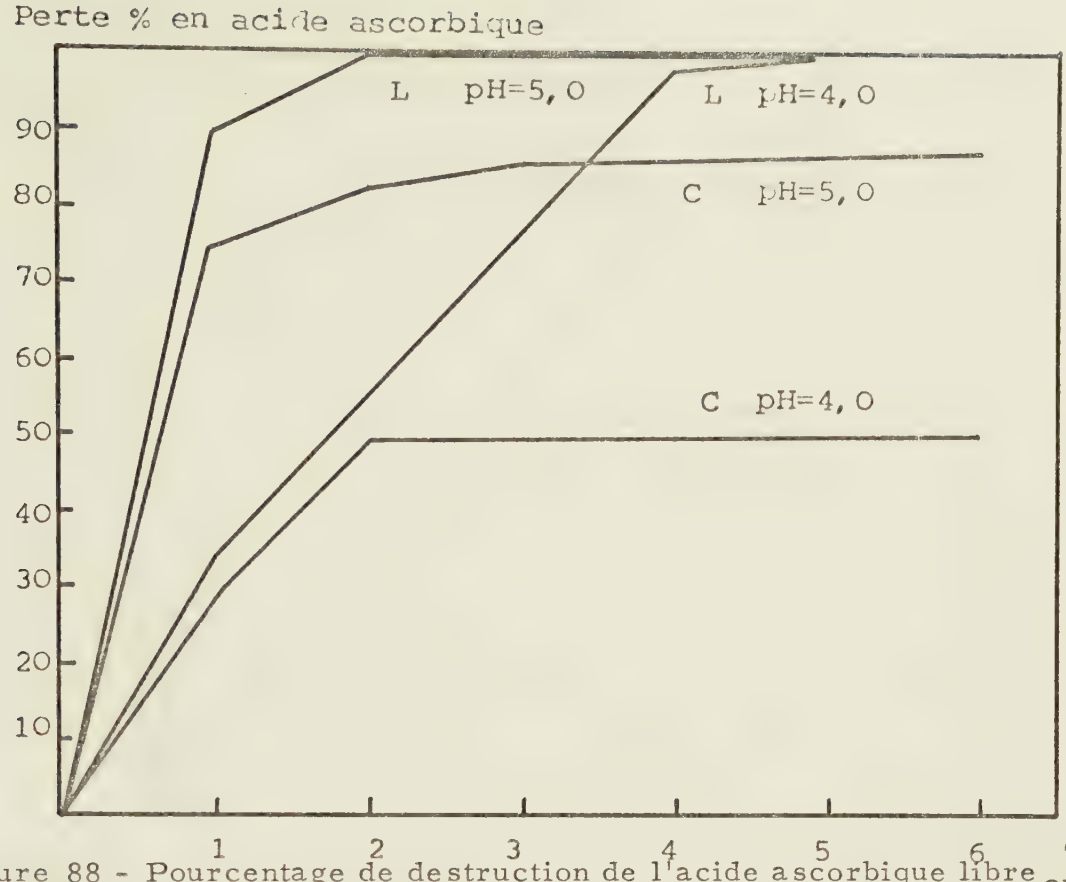
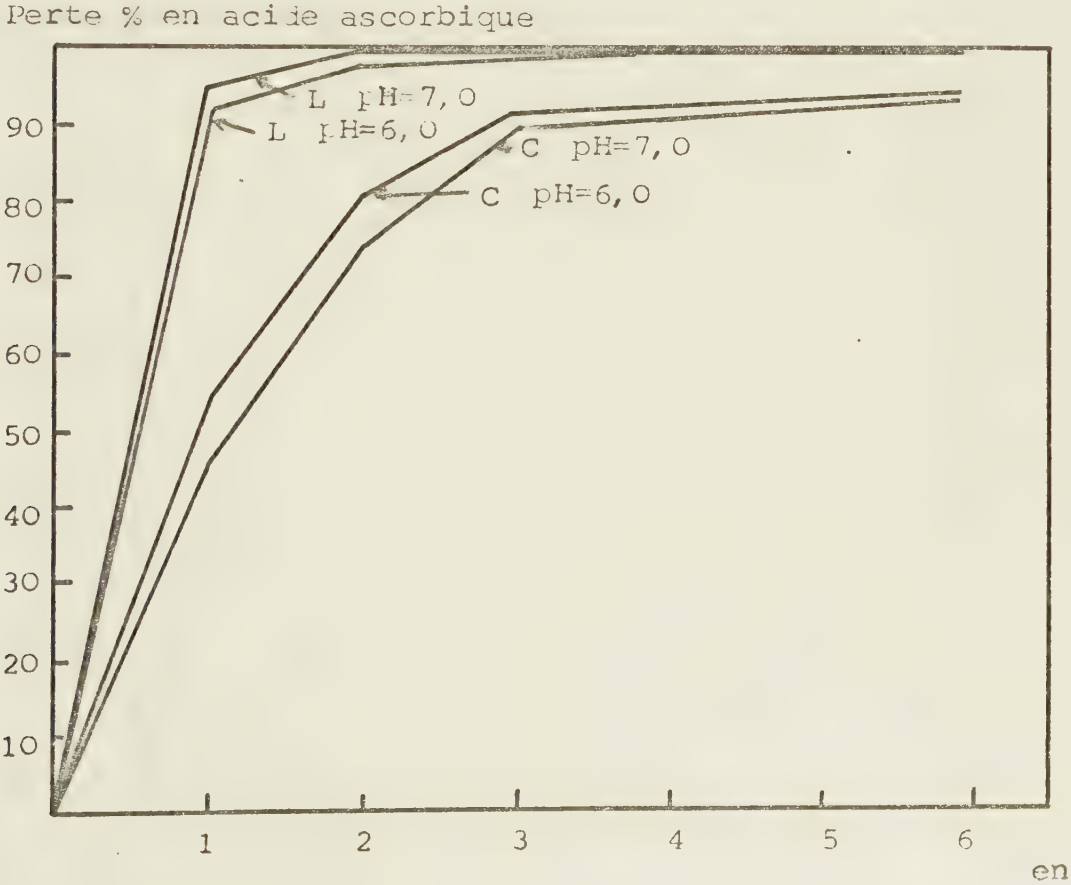


Figure 88 - Pourcentage de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Cu (0,2 µg/ml) en fonction du pH et du temps.



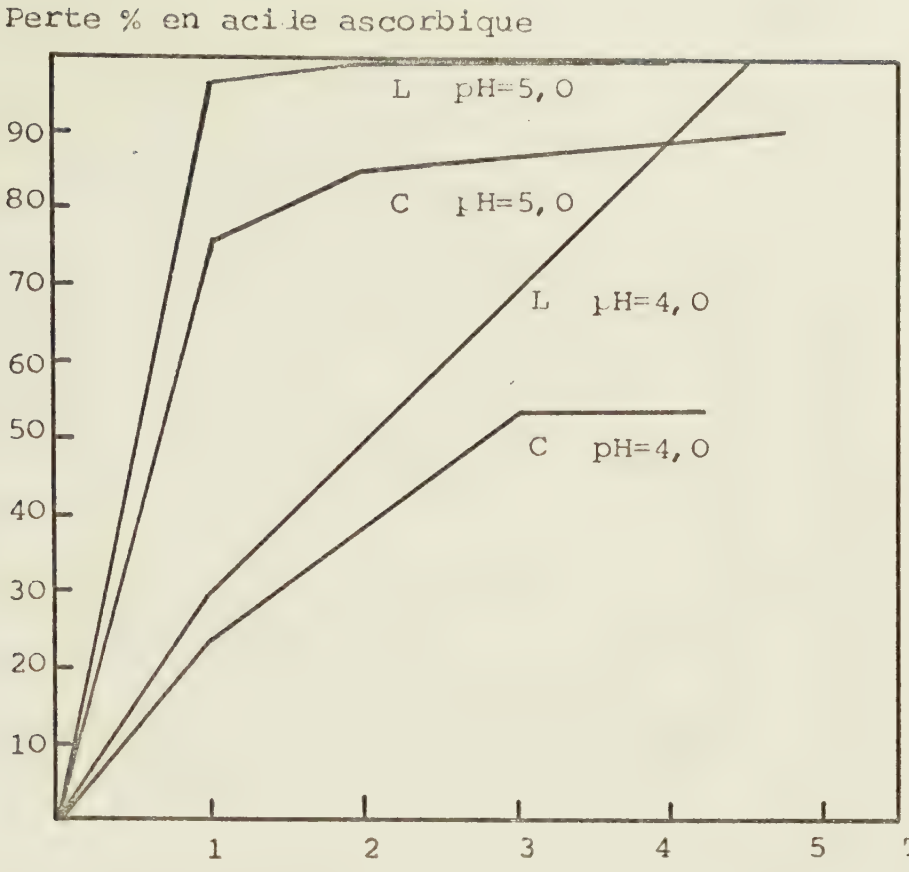
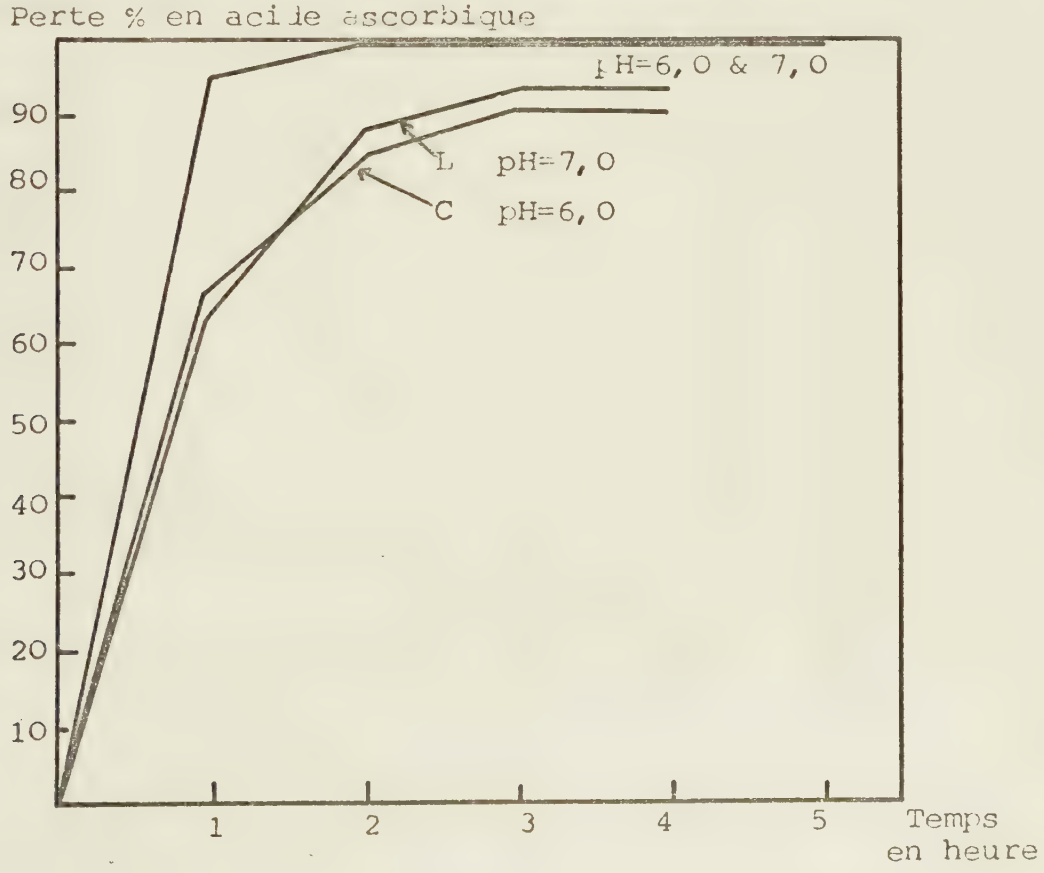
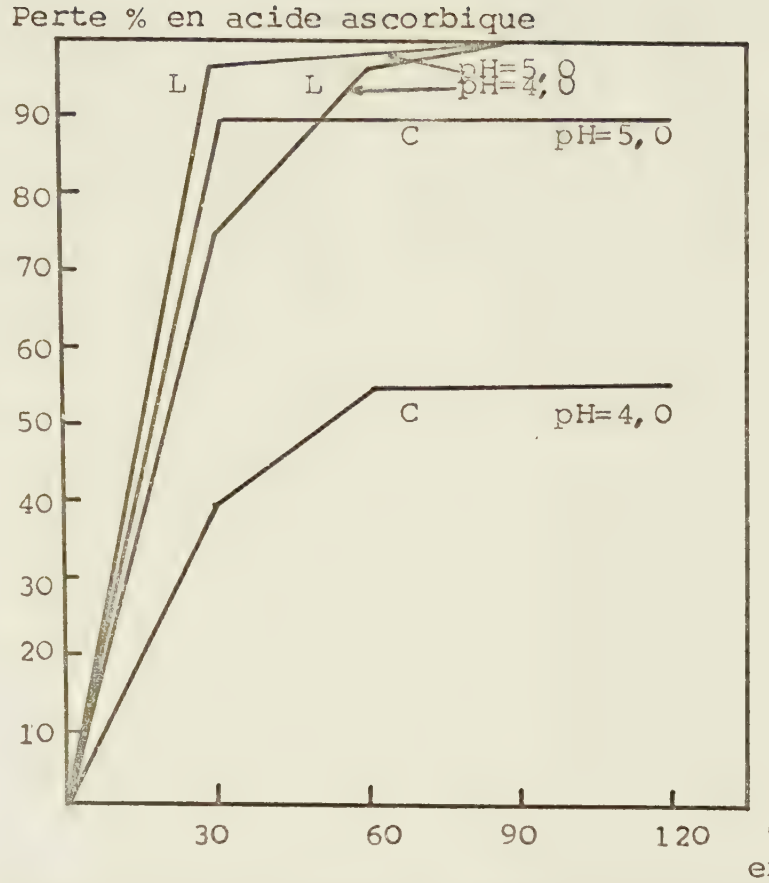


Figure 89 - Pourcentage de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Cu (0,4 µg/ml) en fonction du pH et du temps.





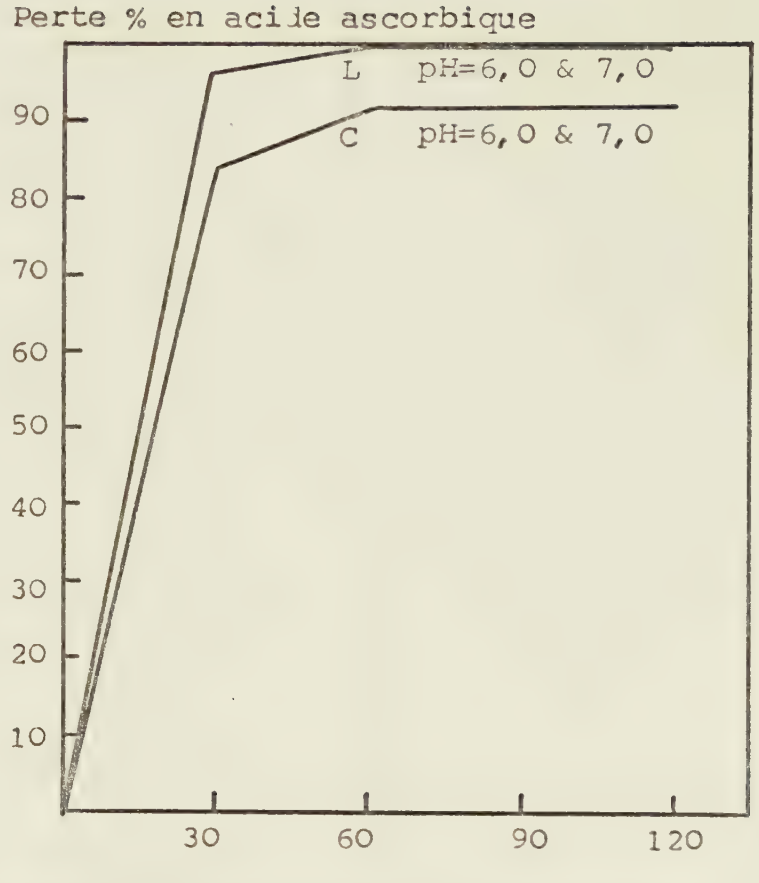


Figure 90 - Pourcentage de destruction de l'acide ascorbique libre et complexé en présence de Cu (2,0 µg/ml) en fonction du pH et du temps

citrique dans le milieu aqueux ambiant.

- Conditions expérimentales.

A la solution de complexe ascorbique on ajoute de l'acide citrique dont la concentration finale est 1g/l.

Ce mélange est dialysé pendant 12 heures contre de l'eau distillée (dialyse à l'équilibre).

- Résultats.

Après la dialyse, nous avons mesuré spectrophotométriquement la quantité d'acide ascorbique fixé qui a été chassée du complexe β-lactoglobuline par l'acide citrique. Nous avons ainsi trouvé que 80% de cette quantité précédemment fixée se trouve détachée du support protéique.

En ces conditions la quantité du ligand ascorbique qui demeure fixée est trop faible pour justifier une tentative d'application pratique. L'expérimentation n'a pas été poussée plus avant car dans un système complexe renfermant à la fois de la β-lactoglobuline complexée à l'acide ascorbique et où à l'acide citrique ainsi que les acides citrique et ascorbique libres, l'ininterprétation des résultats eut été éminemment délicate. Dans la ligne de nos recherches ils n'eusent apporté aucun élément positif.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV -

Le présent chapitre a eu pour but essentiel d'évaluer comparativement la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique libre et complexé à la β-lactoglobuline.

a- L'expérience a montré qu'en présence de l'air et à température ambiante le fait d'être complexé protège assez considérablement l'acide ascorbique quel que soit le pH.

C'est toujours à pH 6,0 que l'on note le plus grand pourcentage de perte.

b- Les métaux lourds étant des catalyseurs d'oxydation, nous avons recherché si la destruction de l'acide ascorbique complexé est accélérée du fait de leur présence.

- L'accélération est fonction de la nature du cation. Elle est d'autant plus importante que sa concentration est elle-même plus élevée, mais il peut exister un seuil comme dans le cas du manganèse au delà duquel une surcharge supplémentaire n'augmente plus la vitesse de destruction de l'acide ascorbique.

- En présence de traces de métaux lourds, cette destruction est maximale et ne se situe plus à pH 6,0, mais à pH 5,0.

c- Etant donnée l'agressivité des métaux lourds, nous avons songé à la diminuer en complexant préalablement ceux-ci avec l'acide citrique.

Il n'a pas été donné suite à cette tentative parce que l'introduction d'acide citrique plus ou moins neutralise dans une solution de complexe β-lactoglobuline + acide ascorbique, a pour résultat immédiat de déplacer plus de 80 p. 100 du ligand vitaminique.

Dès lors, l'éventuelle protection de l'acide ascorbique ne résultant plus que très partiellement de sa fixation sur une protéine, son étude sortait du cadre imparti aux présentes recherches.

Enfin la faible concentration en vitamine C de ces nouveaux complexes ne nous a pas semblé compatible avec une possibilité d'utilisation pratique.

CONCLUSIONS GENERALES.

Le présent travail a été entrepris dans un double but. Il s'agissait tout d'abord de rechercher si l'acide ascorbique était susceptible de se fixer sur des protéines et de préciser les conditions de concentration, pH et température capables de permettre le plus haut niveau de fixation. Le résultat escompté était l'obtention de protéines dont le taux de vitaminisation serait connu et qui pourraient de ce fait trouver une application pratique.

A cette fin, il convenait de commencer l'expérimentaion sur un "moldèle" protéique et la sérum albumine fut choisie pour servir à cette fin.

La technique de dialyse à l'équilibre permit d'évaluer un pourcentage de fixation en fonction de divers paramètres. En règle générale une augmentation du pH au dessus du point isoélectrique et une élévation de la température favorisent la fixation.

L'importance de la fixation du ligand vitaminique sur une quantité donnée de protéine est d'autant plus importante que sa concentration est élevée. Toutefois plus la fixation devient abondante, plus le rapport :.
Acide ascorbique libre / acide ascorbique fixé sur la protéine devient élevé.

Enfin, le présence de faibles concentrations de chlorure de sodium dans le milieu où s'opère la complexation du ligand avec la sérum albumine diminue considérablement le pourcentage d'une fixation dont les modalités s'avèrent alors relativement compliquées.

Dans tous les cas précédemment étudiés, nous nous sommes attaché à compléter l'étude quantitative de la fixation par une étude structurale.

Le but recherché était à la fois de con-

firmer la réalité de la fixation du ligand ascorbique et de préciser les modifications de la stucture spatiale de la protéine provoquées par cette fixation.

Les résultats les plus intéressants concernent le masquage des restes d'acides aminés fluorescents (tryptophane et tyrosine) et l'organisation apparemment structurée du ligand. Cette structuration traduite par l'augmentation de l'extrêmum négatif du spectre d'effet Cotton se superpose à celle de la protéine-support. Elle est d'autant plus importante que la quantité de ligand complexée est elle-même élevée.

Le remplacement de la sérum albumine par la β-lactoglobuline a permis de confirmer dans leurs grandes lignes les résultats précédemment acquis et aussi de les compléter.

C'est ainsi qu'après avoir évalué en fonction du pH, le nombre des sites de fixation de l'acide ascorbique sur cette protéine, divers points importants ont été précisés.

En premier lieu, nous avons montré que la thermo coagulation préalable maintenait et même augmentait légérement l'affinité de la β-lactoglobuline pour l'acide ascorbique.

Une étude plus poussée de la fixation en présence de chloruresalcalins prouve qu'une opposition à la fixation du ligand résultait de la nature du cation et se manifestait dans l'ordre :

$$Na < K < Li$$

Des investigations du même ordre comparativement poursuivies au niveau de l'anion sur divers halogénures de Na a permis de constater que l'ordre croissant d'opposition à la fixation du même ligand ascorbique s'inscrivait selon :

$$F^- > Cl^- \geqslant I^-$$

Si la présence de faibles concentrations d'halogénure diminue toujours considérablement la

quantité de ligand fixé, la nature du cation et celle de l'anion influent donc nettement sur l'importance de cette diminution.

Contrairement aux halogénures, les sels d'acides oxygènes favorisent la fixation de l'acide ascorbique sur la protéine.

Déjà entrevue dans le cas des phosphates, lors des recherches sur la sérum albumine cette propriété a été confirmée puis étendue au cas de $NaNO_3$, Na_2SO_4, et des acides pyro- et tripolyphosphorique. Si certains de ces acides sont normalement présents dans des denrées alimentaires, d'autres sont susceptibles d'y être intentionnellement ajoutés.

Au cours de ces investigations, nous nous sommes constamment préoccupé de connaître la répercussion de la présence de ces sels sur la structure de la β-lactoglobuline et celle du complexe ascorbique.

En cas d'application pratique de la vitaminisation d'une protéine d'opération devrait donc s'effectuer en un milieu privé d'halogénures. Même si pour des raisons de commodité, le complexe vitaminique devait ultérieurement se trouver an contact de concentrations relativement élevées du chlorure par exemple, ce contact ne provoquerait qu'une décomplexation très partielle du ligand. La quantité demeurant fixée est toujours plus considérable que celle qui pourrait se fixer directement en présence de la même concentration chlorurée.

Toujours dans l'optique d'une application pratique, il paraitrait intéressant de réaliser la vitaminisation en présence de phosphate ce qui augmenterait la quantité de ligand complexée sans altérer bien au contraire la valeur alimentaire du produit traîté.

Le deuxième but poursuivi consistait à savoir si l'acide ascorbique complexé résistait mieux à l'oxydation que l'acide libre.

A cette fin nous nous sommes livré à

de multiples essais comparatifs en faisant varier le pH. Les résultats montrent que la complexation protège toujours considérablement l'acide ascorbique contre l'oxydation, et ceci apparait comme une notion d'une grande importance.

La protection ainsi apportée n'est évidemment pas absolue. Si elle s'avère moins élevée à pH 6,0, elle est particulièrement efficace à pH 5,0 et 7,0. Comme il est notoire que des traces de métaux lourds catalysent l'oxydation de l'acide ascorbique, et comme de telles traces peuvent se retrouver tant dans les aliments naturels que dans les aliments composés destinés à l'alimentation animale et auxquels on ajoute un condiment minéral, nous avons testé en présence de traces de métaux lourds Fe, Mn, Cr et Cu, la résistance à l'oxydation de l'acide ascorbique préalablement complexé à la β-lactoglobuline. L'agressivité de ces métaux s'inscrit dans l'ordre décroissant :

$$Cu > Cr > Fe > MN$$

Il s'avère que si de telles traces métalliques accélèrent la destruction oxydative de la vitamine C libre, leur action se manifeste dans le même sens lorsque le ligand vitaminique est complexé à la protéine. Toutefois, ici encore, la complexation préalable apporte une importante protection.

En considérant l'allure des courbes de destruction, au contact de l'air et en présence de métaux lourds, de l'acide ascorbique complexé à la β-lactoglobuline, nous avons remarqué à plusieurs reprises et notamment en présence de fer que l'oxydation de la vitamine s'effectuait apparemment en deux temps. Une première période rapide concernerait l'acide ascorbique fixé à la protéine par des liaisons de faible énergie tandis que les molécules de ligand plus étroitement rattachées résisteraient beaucoup mieux à l'agressivité de l'environnement.

Pour tenter d'accroître si possible cette

protection, nous avons songé à citrater le milieu afin de n'avoir pratiquement plus de cations lourds au contact du ligand, mais seulement leurs complexes citriques. Ce projet a dû être abandonné car en présence d'acide citrique une proportion considérable du ligand ascorbique est libéré de son support protéique.

Quoiqu'il en soit, le double but recherché a été atteint : nous avons fourni les éléments permettant de réaliser des complexes protéiques renfermant une quantité déterminée de vitamine C et nous avons montré que de cette vitamine ainsi complexée était beaucoup plus stable que la vitamine libre.

En ce qui concerne les opérations de vitaminisation, elles pourraient s'envisager de deux façons différentes selon que la protéine à vitaminiser serait à l'état solide (après thermo coagulation par exemple) ou à l'état dissous.

Dans le premier cas, après un contact entre la protéine et l'acide ascorbique, l'excès de cet acide non fixé serait enlevé par essorage er la matière première séchée par passage sous vide à travers de fines filières.

Dans le second cas, les opérations seraient plus longues. Après mélange des solutions de protéine et de vitamine, la solution de vitamine C non fixée serait éliminer à travers les pores d'une membrane qui retiendrait le complexe formé entre la protéine et l'acide ascorbique.

Le complexe serait remis en solution concentrée et soumis à un séchage par pulvérisation à l'abri de l'air.

Dans l'un et l'autre cas, la vitamine C non fixée serait recyclée.

Telles sont, dans leurs grandes lignes, les applications que nous prévoyons à nos résultats.

BIBLIOGRAPHIE.

1 - FRANCOIS, A., Cahiers de Nut. et Dict. 1972, 8 (suppt. fas 2) 51-57.
2 - FRANCOIS, A., C, LHUISSIER, M. An- Nute - Alins 1970, 24, B535.
3 - BROOKE, C. L. J. Agric. food, chem 1968, 2, 163-167.

4 - J. C. DEBOURGE, P. V. CREAC'H proc. verb- soc. sci. phys. Nat, Bordeaux 1965 séance du 24 juin p. 209.
5 - DEBOURGE, J. C., CREAC'H, P. proc. verb, soc. sci. phys. Nat. Bordeaux 1965 - p 220 - 223.
6 - KLOTZ, I. M. (1953) "the proteines" IST ed., 1B 727.
7 - KARUSH, F. 1969 Private Communication.
8 - PALLANSCH, M. J., and D. K. BRIGGS (1954) jacs 76, 1396.
9 - KAY, A., REYNOLDS, J. A. polet, H and steinhard; J. (1966) Biochemistry 5 - 2606.
10- REYNOLDS, J. A. Herbert, polet, H, and Steinhard J. (1967) Biochemistry 6-937.
11- Mc MENAMY, R. H., MADEJA, H. I. and WATSOM, F. (1968) J. Biol. Chem. 243 - 2328.
12- HILL, R. M., and BRIGGS, D. R. (1956), j. Am. Chain. Soc. 78, 1590.
13- VAN OSS. b. j.; Anal. Biochem, 20 (3) 556 - 558 (1967).
14- STEINHARDT, J. et RAYNOLDS J. " multiple équilibria in proteins" 1969, Academic Press 1969.
15- STEINHARDT, and J. A. REYNOLDS, "multiple équilibria in proteins" 1969 - New York and London p. 45.
16- GUILLERME, J. l'ultra-violet, coll. Que sais-je 1963 u. 662 p. 91.
17- BARAUD, J. Bull-soc. chim. France, 1951 - 18, 837 - 843.
18- BARAUD, J. Bull- soc. chim. France, 1953 20, 521 - 525.
19- ADELE, S. Radio Dénaturation de la Sérum albumine bovine. Incidence sur les possibilités de fixation de Riboflavine - 5' - monophosphates- Thèse Doctorat en Sciences Biologiques -Bordeaux 1970.

20 - DEBOURGE, J.C., comportement de la l-Tyrosine et des restes Tyrosyl des protéines en fontion de l'environnement - Thèse Doctorat - és- sciences biologiques Bordeaux 1970.
21 - MOFFITT, W. Proc. Nat. Acad. sc. 1956, 42 736.
22 - KAUZMANN, W. Adv. Protein, Chem. 1959, 14, 7.
23 - JIRGENSONS, B. Arch. Biochem. Biophys. 1958 7457.
24 - SCHELLMAN, J.A. Trav. Lab. Carlsberg, sci. chim. 1958, 30, 463.
25 - CARVER, J.P., SCHECHTER, E. BLOUT, E.R. J. Amer. chem. Soc. 1966, 88, 2562.
26 - TOMIMATSU, Y, CAFFIELD, W., Biopolymers 1965, 3, 509.
27 - Optical Rotatory Dispersion of proteins ans other Macro-molecules - Springer Verlag Berlin 1968.
28 - DUPONT, M., C.R. Acad. sci. 1962, 254, 3137.
29 - MOFFITT, W., J. Chem. phys. 1956, 25, 467.
30 - YANG, J.T. et DOTY, P., J. Am, chem., Soc., 1957, 79, 761.
31 - STMPSON, R. et KAIZMANN, W., J. am, chem. soc. 1953, 75, 5139.
32 - EDELHOCH, H., STEINER, R.F. (1964). Electronic aspect of biochemistry p. 7, PULLMAN. B. Academic Press. N. Y. and LONDON.
33 - WEBER, G., TEALE, F. (1957) Biochem. J. 65, 467.
34 - BANERGEE, D.K.,CHATTERJEA , J.B., Bull, Calcutta, school, Trop, Méd. 1961- 9, 54 - 56.
35 - DESCREZ, DE TRAVERSE, Transport, function of plasma proteins. Paris -1965, WEST European, sumposia ou Clinical Chemistry.
36 - BENHOLD, Transport, Function of plasma protein Paris 1965 - West European, symposia, ou clinical chemistry.
37 - CHEN, P.S.J., HILLS, I.H, BARTTER, F.C.. J. Endocrinol, (1961), 23, 126 - 137.
38 - STAFFORD, W.L., Biochem, pharmacol 1962, 2, 685 - 692.
39 - RAOULT, Y. Transport Function of plasma proteins West European, symposia ou clinical chemistry 1965, 5, 99 - 119.

40 - INNES, CHALK, K.J., KODICEK, E - Biochem J. 1960 - 74, 22- 23p.
41 - VOTH, MILLER, O.L., R. C Arch -Biochem Biophys. 1958, 77, 191-205.
42 - DEBOURGE, J.C., Proc. Verb. soc., sci., phys Nat. Bordeaux 1964 séance du 25 juin p. 263.
43 - Radio - dénaturation de la sérum albumine bovine ADELE, S. Thèse 3e cycle p.9.
44 - BLOUT, E.R., SCHMIER, I., et SIMMONS, N.S. J. Ame. chem. soc. 84, 1962- 3193.

45 - SCATCHARD, G. Am. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 1949.
46 - YON, J., Sturcture dynamique conformationnelle des protéines 1969- p. 136-137. HERMANN. Edit. Paris
47 - PANTALONI, D. (1965). Thèse Doctorat és Sciences physiques Paris.
48 - ASCHAFFEMBURG, R. et DREWRY, J. Nature 176, 218 (1955).
49 - BELL, K. Mc KENZIE, H.A., Nature 204, 1275 1964.
50 - GROSCLAUDE, F., et Coll. Am., Biol., animal Biochem Biophys. 6, 215, 1966.
51 - VALENTIN, B. 1972, Doctorat en Sciences Biologiques Bordeaux pages 52 - 55.
52 - ASCHAFFEMBURG, R. et DREWY, J. Biochem. j. 65, 273 (1957).
53 - TIMASHEFF, S.N. et TOWNEND, R., j. DAIRY Sci, 45, 259 - 1962.
54 - LONTIE, R. et PREAUX, G. dans "protides on biological fluids" H. PETTERS, ed. p. 475, ELSEVIER Amesterdam.
55 - AZANZA, J.L., (1972) Thèse doctorat en science biologiques p. 12 Bordeaux.
56 - GREEN, D.W. et ASCHAFFEMBURG, R. J. mol. Biol. 1, 54 - 1959.
57 - TANFORD, C. J. Am. Chem. Soc. 84, 4240, 1961
58 - GEORGES, C. et GUINAND, S. J. chem. phys. 57, 606, 1960.
59 - TESSIER, J.P. (1972) Mémoire , Conservatoire National des arts et métiers. Bordeaux.
60 - LEWIS, M.S., SAROFF, H.A. (1957) J. Am. chem Soc. 79, 2112.
61 - SAROFF, H.A. (1957), Arch. Biochem. Biophys. 71, 194.

62 - VALENTIN, B., (1972) Thèse Doctorat en Sciences Biologiques p. 65 Bordeaux.
63 - CURDA, D., SLAVICEK, E., et KYSTINK, V. (chem. Techol "HOCHSEH, Prague" Nahrung 11 (1) 71 - 86 (1967).
64 - ROEMER, Renate et W., SCHARTZ (univercifs wald, Ger) Z. Allgem. Microbiol. 5 (2), 122- 35 (1965) (Ger).
65 - TAQUI KHAN, M. M. et MARTELL, A. E., "Clark univ. Worcester Hass" J. Amer. Chem. Soc. 89 (16) 4176 - 85 (1967) Eng.
66 - OGATA, YOSHICRO, KOSUGI, YOSHIO (Nagoya univ. Nagoya. Japan). Tetrachedron 1969, 25 (18) 4633 - 41 (Eng.)
67 - CHEPURKO, V. K. (USSR) Tovarovedenic 1967, 2, 3, 7 - (Russ).
68 - YASHEHENKO, V. K. et ISHEHENKO, I. Sb Nauch. Tr. Vitebsk med. inst. 11. 152-8 1964 (Russ).
69 - BAKURDZHIEVA, N. et IORDANOV, N., C. R Acad. Bulg. Sci. 20 (6) 591 - 3 (1967) (Eng.)
70 - OGATA, Y., KOSUGI, Y. et MORIMOTO, T., (Wagoya Univ. Nagoya JAPAN). Tetracedron 24 (10), 4057 - 66 - (1968) (Eng.)
71 - FUKUDA, Terno, MIYAKAWA, Kimie et Tamiko UEKI, Showa Yakka Daigaku Kiyo N° 5, 1-8 (1967) Japan.

Vu et approuvé,

Talence le

Le Président de l'Université

de Bordeaux I.